



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS

“NIVELES PLASMÁTICOS DE MELATONINA EN LA HIPNOSIS
ANESTÉSICA EN HUMANOS CON MIDAZOLAM Y PROPOFOL”

Memoria que para optar al grado de Doctor en Medicina
presenta el Licenciado

D. Manuel Ruiz Castro

Alcalá de Henares, fecha

firma

DON JOSÉ LUIS BARDASANO RUBIO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y
PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

CERTIFICA: Que el trabajo original de investigación clínica
verificado por **DON MANUEL RUIZ CASTRO** para optar al grado de
Doctor y relativo a “**NIVELES PLASMÁTICOS DE MELATONINA
EN LA HIPNOSIS ANESTÉSICA EN HUMANOS CON
MIDAZOLAM Y PROPOFOL**” ha sido llevado a cabo bajo mi
dirección durante los años 2000 a 2005. Asimismo hago constar que una
vez revisada la presente memoria, la encuentro apta para defensa ante
tribunal.

Alcalá de Henares, FECHA

FIRMA



Universidad
de Alcalá

DON AGUSTÍN ARIAS CABALLERO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y
PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

CERTIFICA: Que el trabajo original de investigación clínica
verificado por **DON MANUEL RUIZ CASTRO** para optar al grado de
Doctor y relativo a “**NIVELES PLASMÁTICOS DE MELATONINA
EN LA HIPNOSIS ANESTÉSICA EN HUMANOS CON
MIDAZOLAM Y PROPOFOL**” ha sido llevado a cabo bajo mi
dirección durante los años 2000 a 2005. Asimismo hago constar que una
vez revisada la presente memoria, la encuentro apta para defensa ante
tribunal.

Alcalá de Henares, FECHA

FIRMA

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Miguel Ángel Palma Gámiz, amigo y maestro, y sin cuya desinteresada ayuda y aliento no podría haber realizado este trabajo.

Al Servicio de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares, por su especial contribución, y en especial al Dr. Antonio Planas Roca, jefe y alma de éste.

A los Departamentos de Farmacología, Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá, por su ayuda y empleo del material necesario para la elaboración de este estudio.

Al Departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares, y en especial al Dr. Ignacio Arribas, por su amable colaboración y por permitirme también el empleo del material necesario para el desarrollo de esta memoria.

Por último, a todos aquellos que de alguna manera han colaborado o sufrido este trabajo, el testimonio sincero de mi agradecimiento.

ÍNDICE

	Págs.
RESUMEN TESIS INGLÉS	I-XX
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. ASPECTOS GENERALES	1
1.2. ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA PINEAL	4
1.3. RESUMEN HISTÓRICO	6
1.3.1. Historia de la Anestesia General	6
1.3.2. Historia de la Anestesia Intrarraquídea	8
1.3.3. Historia de la Glándula Pineal	8
1.3.4. Historia de la Melatonina	10
1.3.5. Historia de las Benzodiacepinas	11
1.3.6. Historia del Propofol	11
1.4. ANESTESIA GENERAL	12
1.4.1. Inhalatoria	13
1.4.2. Intravenosa	13
1.5. ANESTESIA REGIONAL	15
1.6. SEDACIÓN INTRAVENOSA	16
1.7. MIDAZOLAM	18
1.8. PROPOFOL	23

	Págs.
1.9. MELATONINA	25
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
3. PACIENTES Y MÉTODO	30
3.1. MÉTODO DE ESTUDIO	31
3.1.1. Ámbito del estudio	31
3.1.2. Sujetos del estudio	31
3.1.3. Criterios de inclusión	32
3.1.4. Criterios de exclusión	32
3.1.5. Recogida de datos	33
3.1.6. Recogida de efectos adversos	34
3.1.7. Instrumental	34
3.1.7.1. Principios del test	35
3.1.7.2. Procedimiento de extracción	36
3.1.7.3. Preparación de reactivos	38
3.1.7.4. Procedimiento de ensayo	39
3.1.7.5. Cálculo de resultados	40
3.1.7.6. Especificaciones técnicas	43
3.2. MÉTODO ESTADÍSTICO	50

	Págs.
3.2.1. Diseño	50
3.2.2. Sujetos de estudio	50
3.2.3. Variable dependiente	50
3.2.4. Variable independiente	50
3.2.5. Variables de confusión	51
3.2.6. Tamaño de la muestra	51
3.2.7. Base de datos	52
3.2.8. Análisis estadístico	52
4. RESULTADOS	54
4.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	
4.1.1. Datos demográficos	55
4.1.1.1. Edad	55
4.1.1.2. Género	58
4.1.2. Datos clínicos	67
4.1.2.1. Grado funcional	67
4.1.2.2. Parámetros de monitorización	67
4.1.2.3. Duración de la cirugía	68

	Págs.
4.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS EN BASE AL ESTUDIO ESTADÍSTICO	
4.2.1. ANOVA de medidas repetidas de las concentraciones	
de melatonina en los diferentes tiempos	70
4.2.2. ANOVA univariante de las concentraciones	
de melatonina basales	77
4.2.3. ANOVA univariante de las concentraciones	
de melatonina en el minuto 10 tras iniciar la sedación	81
4.2.4. ANOVA univariante de las concentraciones	
de melatonina en el minuto 60 tras iniciar la sedación	85
4.2.5. ANOVA univariante de las concentraciones	
de melatonina en el minuto 90 tras retirar la sedación	89
5. DISCUSIÓN	95
6. TESIS Y CONCLUSIONES	104
7. BIBLIOGRAFÍA	107



Universidad
de Alcalá

SCHOOL OF MEDICINE

DEPARTMENT OF MEDICAL SPECIALTIES

**“PLASMA MELATONIN LEVELS IN HUMAN ANESTHETIC HYPNOSIS WITH
MIDAZOLAM AND PROPOFOL”**

D. Manuel Ruiz Castro

ABSTRACT

Background: Studies of the narcotic and sedative effects of melatonin seem to demonstrate certain hypnotic capacity. Therefore some hypnotic drugs would be related with an increase in plasma melatonin levels.

Methods: We searched for the influence of propofol and midazolam administration on this way in thirty healthy patients undergoing spinal anesthesia for lower limb procedures. Patients were randomly assigned in three groups: midazolam sedation (0.05-0.1 mg/kg/h), propofol sedation (3-4 mg/kg/h) and anesthesia without sedation. A basal control group and a theoretical reference curve were also compared. Melatonin levels were measured at 10 and 60 min after initiating sedation and 90 min after withdrawing it. Basal levels were obtained in all groups.

Results: The patients showed no differences in basal levels ($P>0.269$). Circulating melatonin concentrations did not vary at 60 min after initiating sedation ($P=0.491$) or 90 min after stopping it ($P>0.093$). Statistical differences were detected 10 min after initiating sedation between the no sedation group respect to the propofol ($P<0.001$) and reference curve ($P<0.000$) groups.

Conclusions: Due to propofol produces a plasma melatonin peak we suggest an effect of this hypnotic drug on the pineal gland. Midazolam doesn't increase or decrease plasma melatonin levels.

INTRODUCTION

The hormone melatonin is produced in the pineal gland during the night by the N-acetylation and 5-methylation of serotonin, although melatonin is also synthesized in other areas of the body. It plays an important role in regulating the sleep-wake cycle.

Its circadian rhythm is regulated by the pineal sympathetic nerves (nervi coronarii) that controls the N-acetyltransferase activity. This enzyme catalyses the melatonin formation. The sympathetic discharge is stimulated by retino-hypothalamic fibers and suprachiasmatic nuclei. Also the norepinephrine released in the sympathetic endings acts on β -adrenergic receptors increasing the enzyme activity, the melatonin synthesis and its secretion. It is metabolized in the liver to 6 – hydroxymelatonin and is excreted in urine as 6-sulfatoxymelatonin (80-90%).

Plasma melatonin levels during daytime (12:00 h to 20:00 h) range from 5 to 20 pgr/ml, while at night they can reach 55-90 pgr/ml, with a marked interindividual variation depending on the age.

The plasma melatonin half life is approximately 47 min and altered patterns in its liberation exist in sleep disorders, Jet-Lag syndrome, depression, schizophrenia, pregnancy, hypothalamic amenorrhea, anorexia nervosa, some forms of cancer and puberty. Studies of the narcotic and sedative effects of melatonin seem to demonstrate certain hypnotic capacity.

The effects of hypnotic drugs on melatonin levels have been poorly studied in humans. So it would be interesting to complete the study of this hormone whose functions are not fully known yet, and whose exogenous administration could be approved in the future. Therefore, we searched for its influence in the artificial sleep carrying out a randomized study in humans undergoing hypnosis with midazolam and propofol, evaluating the cause-effect relationship between the drugs administration and the changes in plasma melatonin concentration.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Melatonin can be involved in the mechanism of action of substances with hypnotic capacity used in anesthesia. Also, this hormone could act as mediator of other hypnotic drugs whose action place is even unknown.

The hormone melatonin secreted by the pineal gland, seems to have a clear effect on the natural sleep. Our objectives have been:

1. To value its influence in the artificial sleep carrying out an observational, prospective and randomized study in humans undergoing hypnosis with midazolam or propofol.

2. To observe possible changes in melatonin concentration during the anesthetic hypnosis.

3. To evaluate the cause-effect relationship between the administration of hypnotic drugs and the changes in plasma melatonin levels.

METHODS

All the study was performed in Alcalá de Henares University Hospital, a regional hospital in central Spain, and informed consent was obtained from each participant.

Study Subjects

Realization of spinal anesthesia (spinal set, 27-G Whitacre, Braun, Melsungen, Germany) with 15 mg of hyperbaric bupivacaine 0.5%, and sedation with propofol 3-4 mg/kg/h in continuous intravenous perfusion.

Realization of spinal anesthesia (spinal set, 27-G Whitacre, Braun, Melsungen, Germany) with 15 mg of hyperbaric bupivacaine 0.5%, and sedation with midazolam 0.05-0.1 mg/kg/h in continuous intravenous perfusion. To register the changes of plasma melatonin concentration, from basal levels (approximately 10 pgr/ml), to hypnotic (higher or similar to 40 pgr/ml) after propofol or midazolam administration.

Spinal anesthesia under identical conditions without sedation. To appreciate the possible influence of the anesthesia and/or surgery on indol levels.

Basal control. Taking a basal unique sample in healthy voluntary subjects with selection criteria. As intraassay control group over the basal values, in patients not subjected neither to anesthetic nor to surgical stress.

Reference curve. Basal and hypnotic levels described in the literature.

Selection criteria

Patients of 18-50 years of age and of both sexes, ASA-I (no concomitant pathology) scheduled for lower limb surgery whose operation took place between the 12:00 h, and the 17:00 h.

Exclusion criteria

Younger than 18 years and older than 50 years. Hypersensibility to the drugs included in the study. Peroperative use of any different drug besides the one included in the design. Pregnancy, amenorrhea, mental dysfunctions, sleep disorders previous to the study (included the previous day to the intervention) and endocrinological dysfunctions. Data was collected through anamnesis and clinical history review.

Data collection

- Recruitment of patients and the first blood sample were performed in the preanaesthetic evaluation.
- Patients allocation in the different groups.
- Non invasive arterial pressure monitorization, electrocardiography and pulseoximetry during the surgical act and in the recovery room.
- Blood extraction 10 and 60 min after hypnosis, and 90 min after stopping the hypnotic. A basal sample was also obtained between 12:00 h - 20:00 h in the preanesthetic interview.
- Clinical evaluation of the level of conscience according to the Ramsay scale, extracting the samples when the patient was in a degree of 4 or 5. We recorded:
 - Answer to verbal and painful stimuli.
 - Eyelids reflex reaction and ocular movements.
 - Heart frequency.
 - Tidal volume in spontaneous breathing.

Duration of surgery

Patients selected went under a minimal 60 min long surgery because plasma melatonin half-life is over 47 min. The two samples had to be extracted at 10 and 60 min after hypnosis to detect the possible increase in melatonin levels. Surgical procedures

over two hours were avoided because of the drugs accumulation and recirculation. Only interventions scheduled between 12:00h to 17:00h were recorded, so that changes would be easily appreciated whenever lower levels were obtained because of the circadian rhythm.

Determination of plasma melatonin

All the samples were centrifuged, stored at -20° C and processed by duplicate. Plasma melatonin was analysed by ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, IBL RE 54021, Hamburg, Germany). The sensitivity of the melatonin ELISA was 3.0 pg/ml and the interassay coefficient of variation was 11.3%.

STATISTICAL METHODS

Design

We designed an observational, and prospective study of plasma melatonin levels in humans using random allocation stratified in blocks by sexes with the C4-SDP (Study Design Pack, Glaxo Wellcome, Madrid, Spain).

Sample Size

Sample size was calculated comparing of two means of a sample, using the C4-SDP. Patients $N = 4$ in each group, bilateral test with probable losses of 10%, $\alpha = 0.025$, $\beta = 0.025$, $1 - \beta = 97.5\%$.

We included $N = 10$ patients in each group to compensate for patients later being excluded from the analysis.

Statistical analysis

All the descriptive and analytical study, was performed with the SPSS 10.1 (Statistical Package for the Social Science for Windows) program. We used analysis of variance (ANOVA) to compare age and duration of surgery. For sex differences and a global comparison of plasma melatonin concentrations at the different times, repeated measures ANOVA with *post hoc* Games-Howell test were employed. Also a comparison for each time of blood extraction regarding the different study groups was performed by ANOVA with *post hoc* Games-Howell test. For discrimination of differences, the level of significance was considered to be $P < 0.05$.

RESULTS

Only eight patients were excluded from the enrollment period of study because we did not meet inclusion criteria. No participants were excluded in the allocation, follow up or analysis periods. The patients were 31.1 ± 7.88 years of age. The duration of operations in all study patients was 84 ± 19 min. There were no significant differences between the different study groups in age ($P = 0.129$) or duration of surgery ($P = 0.471$). Sex ratio in every study group was 1:1. No differences were observed in plasma melatonin levels respect to gender ($P = 0.909$).

No influence of the anesthetic/surgical stress was found on melatonin production since all values in no sedation group never surpassed the range of basal levels ($P = 0.000$). It seems that propofol increases the plasma melatonin levels, since a peak of the hormone was appreciated 10 min after sedation. Comparing these values with the reference curve no significant differences were found ($P = 0.890$). Between midazolam and no sedation group no statistical differences were found in this moment ($P = 0.102$).

At 60 min after beginning the hypnosis, were found no differences between midazolam or propofol and no sedation groups ($P = 0.347$). The intravenous continuous perfusion of propofol induces an initial plasma melatonin peak but drug levels remain stable. After 90 min (two plasma hormone half-lives) stopping propofol infusion, no significant differences were observed between midazolam or propofol and no sedation groups, or control group of basal intraoperative values ($P = 0.093$).

No cases of adverse effect and/or complications were registered.

DISCUSSION

We hypothesize that melatonin is involved in the mechanism of action of substances with hypnotic capacity used in anesthesia. The originality of this work resides in there are few publications that evaluate the intravenous administration of hypnotic drugs and the plasmatic changes of melatonin in humans. Most of the publications have been carried out using experimentation animals or they have not been made under suitable conditions.

Studies conducted in rats of the psychotropic agents effect on melatonin synthesis seem to demonstrate alterations in the sensibility of the adrenergic receptors in the pineal gland of these rodents.

Articles have also been published about sedated patients in intensive care units registering the alterations in the hormone secretion. Olofsson et al. studied groups of sedated patients with midazolam, propofol and fentanyl, and Mundigler et al carried out their work with midazolam associated to sufentanil. Due to the employment of opiates, to the great quantity of drugs administered, to the multiple invasive techniques, as well as to the patients general state, the evaluation of the obtained results is very difficult.

In our study midazolam and propofol were selected because of their action to GABA receptors and their possible relation with an alternative mechanism of action. The

hypnotic was continually infused to assure the plasmatic levels were maintained as constant as possible to reach a Ramsay score of 4 (sleeping but with stimuli response) or 5 (sleeping but with weak response), states similar to natural sleep.

The pineal gland presents gabaergic receptors and investigations seem to indicate that some benzodiazepines can inhibit the melatonin secretion on the pineal gland. Alprazolam in humans, and diazepam both in rats and humans, can achieve this even in a single dose. In studies performed on rats *in vivo*, some diazepam metabolites such as nordiazepam, oxazepam and temazepam, do not seem to affect the melatonin secretion.

Divergences exist among the different authors on the form in which the general or regional anesthesia affects the patterns of melatonin liberation in humans. Nishimura et al. did not find significant alterations in the circadian rhythm of the hormone after the employment of general anesthesia, while Reber et al. studied plasma melatonin concentrations in patients anesthetized with isoflurane and propofol, observing an increment in this hormone, being higher in the first group. Kärkelä et al. carried out an investigation in which they compared a group of patients anesthetized under general anesthesia with another under spinal anesthesia, finding diminished saliva melatonin levels in both. Regarding the use of different types of anaesthesia, they did not find any significant differences. These authors used premedication and postoperative analgesia with oxycodone, and isoflurane and fentanyl for the maintenance of general anesthesia. This cannot explain the obtained results, since according to the conclusions of Reber et

al., isoflurane increases the melatonin levels. The same effect occurs with morphine in rats and these effects can be blocked by naloxone. Our point of view is that the spinal anesthesia is unlikely to affect the blood melatonin levels by itself, even more so when a local anesthetic is used without adjuvant drugs. We did not administer fentanyl nor any premedication to avoid possible interferences. Prior to the extraction of the postoperative blood samples no analgesic medication that could alter the hormone level was administered.

With regards to the type of surgery, Nishimura et al. did not detect significant alterations in the pattern of melatonin secretion in surgery as invasive as the oesophagectomy with thoracotomy, while Vician et al. found increased nocturnal hormone levels in patients for colorectal carcinoma surgery. They suggested that the higher levels were a stress response to the major abdominal surgery due to the release of gut melatonin into the circulation, or to stimulation of pineal melatonin production. Reber et al. developed their work on elective gynecological laparoscopic surgery, finding increased melatonin levels, and Kärkelä et al. found a delay in the hormone nocturnal peak in the first night after minor orthopedic surgery for knee ligament injuries. We opted for traumatologic lower limb surgery because regional anesthesia is possible. General anesthesia could affect the melatonin determinations due to the variety and the type of drugs used.

Reber et al. found increased circulating melatonin after general anesthesia with propofol, fentanyl and vecuronium. These levels were intraoperatively maintained. In our study, the intravenous continuous perfusion of propofol causes an initial plasma melatonin peak, but its concentrations fall although the drug levels remain stable. Their theory as the differences found in melatonin levels suggests the possibility of a modulation in the activity of the enzymes involved in melatonin metabolism through an effect on hepatic blood flow. However we explain that these differences are because this group uses premedication with bromazepam and higher dose of propofol (6 to 10 mg/kg/h) than us (3 to 4 mg/kg/h). Also fentanyl employment during surgery and methadone for postoperative pain management can increase the hormone levels. Therefore, a possible interpretation would be that propofol causes an abrupt hormone liberation that drains the cellular reserves through initial occupation of gabaergic receptors. This is very different to the progressive melatonin production during natural sleep at night. Under these conditions no more melatonin can be secreted whereas the drug continues acting on the pineal gland, diminishing its detection in blood.

After two plasma melatonin half-lives (90 min after withdrawing the propofol sedation) we do not observe significant differences between propofol and no sedation groups ($P = 0.093$). This discovery coincides with the determinations of Reber et al. We explain this phenomenon as being due to melatonin metabolism and light activity on pineal gland in the recovery room.

THESIS AND CONCLUSIONS

Respect to our hypothesis, we can assure that melatonin is not implied in the activity of all the hypnotic substances. Propofol increases plasma melatonin concentrations, so this hormone could be involved in the mechanism of action of propofol together with the drug gabaergic effects. Therefore it is possible that propofol acts directly on the pineal gland.

Currently don't exist studies evaluating the increase in plasma melatonin concentration or in the hormone activity as another possible mechanism of action of the hypnotic drugs.

In accordance with our objectives and the obtained results we reach the following conclusions:

1. The relationship of melatonin with the artificial sleep is demonstrated with propofol, but not with midazolam.
2. Propofol causes an increase in plasma melatonin concentration. Intravenous propofol infusion induces a plasma melatonin peak but this does not persist in time.

Midazolam doesn't increase or decrease the plasma melatonin levels. The literature refers decreased hormone levels with another benzodiazepines.

3. With propofol is demonstrated the cause-effect relationship between the drug administration and plasma melatonin changes. The increase in the hormone levels coincides with the beginning of its intravenous perfusion. Also, when we stop the infusion the values return to basal range after two plasma melatonin half-lives. With midazolam we don't observe any change.

So if artificial hypnosis is related to an increase in melatonin release, analogue hypnotic substances could be designed with better efficacy and minor side-effects. Ulterior studies would have to be performed to completely understand the activity of these drugs on the pineal gland.

REFERENCES

1. Wurtman RJ, Moskowitz MA. The Pineal Organ. *N Engl J Med* 1977; 296:1329.
2. Garfinkel D, Laudon M, Noj D, Zisapel N. Improvement of sleep quality in elderly people by controlled- release melatonin. *Lancet* 1995; 346:541-544.
3. Dawson D, Encel N. Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res* 1993; 15(1):1-12.
4. Meissl H, Yanez J. Pineal photosensitivity. A comparison with retinal photoreception. *Acta Neurobiol Exp* 1994; 54:19-29.
5. Silver R, Le Sauter J. Efferent signals of the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rythms* 1993; 8:89-92.
6. Webb SM, Puig-Domingo M. Role of melatonin in health and disease. *Clinical Endocrinology* 1995; 42:221-34.
7. García-Patterson A, Puig-Domingo M, Webb SM. Thirty years of pineal research: do we know its clinic relevance? *J Pineal Res* 1996; 20(1):1-6.
8. Humbert W, Pevet P. The decrease of pineal melatonin production with age. Causes and consequences. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 719:43-63.
9. Reiter RJ. Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp* 1994; 54:31-9.
10. Saletu B. Therapy for sleep disorders in depressives. *Psychopathology* 1986;19:239-62.
11. Harma M. Shift work, jet-lag and sleep. *Duodecim* 1991; 107(18):1469-71.

12. Comperatore CA, Krueger GP. Circadian rhythm desynchronization, jet lag, shift lag and coping strategies. *Occup Med* 1990; 5(2): 323-41.
13. Waldhauser F, Ehrhart B, Forster E. Clinical aspects of the melatonin action: impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroinmunoendocrine interactions. *Experientia* 1993; 49(8):671-81.
14. Nair NP, Sharma M. Neurochemical and receptor theories of depression. *Psychiatr J Uni Ott* 1989; 14(2):328-51.
15. Smythies JR. Biochemical abnormalities associated with schizophrenia. *Br J Psychiatry* 1975; 9:41-7.
16. Sandyk R, Kay SR. Pineal melatonin in schizophrenia: a review and hyphotesis. *Schizophr Bull* 1990; 16:653-62.
17. Gandar R, Collin D. Functional hypothalamic amenorrheas. I Physiopathology. *J Gynaecol Obstet Biol Reprod* 1993; 22(2):127-32.
18. Rosenthal NE, Genhart M, Jacobsen FM, et al. Disturbances of appetite and weight regulation in seasonal affective disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 499:216-30.
19. Parienti V, Kennedy SH, Brown GM, et al. Bulimia, bulimia-anorexia and nocturnal secretion of melatonin and cortisol. *Encephale* 1988; 14(6):421-5.
20. Bartsch C, Bartsch H, Fluchter SH, et al. Diminished pineal function coincides with disturbed circadian endocrine rythmicity in untreated primary cancer patients. Consequence of premature aging or of tumor growth?. *Ann N Y Sci* 1994; 719:502-25.

21. Cavallo A. Melatonin and human puberty: current perspectives. *J Pineal Res* 1993; 15(3):115-21.
22. Sugden D. Sedative potency and 2-[125 I]-iodomelatonin binding affinity of melatonin analogues. *Psychopharmacology Berl* 1995; 117:364-370.
23. Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, et al. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57:552-558.
24. Wakabayashi H, Shimada K, Satoh T. Effects of adrenergic blockers or bicuculline on diazepam induced changes in rat pineal melatonin synthesis in vivo and in vitro. *Chem Pharm Bull* 1991;39:2677-2680.
25. Olofsson K, Alling C, Lundberg D, Malmros C. Abolished circadian rhythm of melatonin secretion in sedated and artificially ventilated intensive care patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:679-684.
26. Mundigler G, Delle-Karth G, Koreny M, et al. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2002;30:536-540.
27. Kruger-Thiemer E. Continuous intravenous infusion and multicompartment accumulation. *Eur J Pharmacol* 1968; 4:317-24.
28. Gambús PL, Schnider TM, Minto CF. Caracterización del perfil de dosificación del remifentanilo mediante simulación con ordenador: estudio comparativo con fentanilo y alfentanilo. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 1998; 45:317-25.

29. Lowenstein PR, González C, Cardinali DP. In vitro uptake of benzodiazepines by rat pineal gland. *J Pineal Res* 1984; 1(3):207-213.
30. Rosenstein RE, Chuluyan HE, Díaz MC, Cardinalli DP. GABA as a presumptive paracrine signal in the pineal gland. Evidence on an intrapineal gabaergic system. *Brain Res Bull* 1990; 25(2):339-344.
31. McIntyre IM, Norman TR, Burrows GD, Armstrong SM. Alterations to plasma melatonin and cortisol after evening alprazolam administration in humans. *Chronobiol Int* 1993; 10(3):205-213.
32. Djerridane Y, Touitou Y. Chronic diazepam administration differentially affects melatonin synthesis in rat pineal and harderian glands. *Psychopharmacology* 2001;154(4):403-407.
33. Monteleone P, Forziati D, Orazzo C, Maj M. Preliminary observations on the suppression of nocturnal plasma melatonin levels by short-term administration of diazepam in humans. *J Pineal Res* 1989;6:253-258.
34. Djerridane Y, Touitou Y. Effects of diazepam and its metabolites on nocturnal melatonin secretion in the rat pineal and harderian glands. A comparative in vivo and in vitro study. *Chronobiol Int* 2003;20(2):285-297.
35. Nishimura S, Fujino Y, Shimaoka M, Hagihiro S, Taenaka N, Yoshiya I. Circadian secretion patterns of melatonin after major surgery. *J Pineal Res* 1998;25(2):73-77.

36. Reber A, Huber PR, Ummenhofer W, et al. General anesthesia for surgery can influence circulating melatonin during daylight hours. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998;42(9):1050-1056.
37. Kärkelä J, Vakkuri O, Kaukinen S, Huang W-Q, Pasanen M. The influence of anesthesia and surgery on the circadian rhythm of melatonin. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002;46:30-36.
38. Esposti D, Esposti G, Lissoni P, Parravicini L, Fraschini F. Action of morphine on melatonin release in rat. *J Pineal Res* 1998;5:35-39.
39. Lowenstein PR, Pereyra EN, González C, Cardinali DP. Effect of naloxone on the nocturnal rise of rat pineal melatonin content. *Eur J Pharmacol* 1984; 98(2):261-264.
40. Vician M, Zeman M, Herichova I, Jurani M, Blazicek P, Matis P. Melatonin content in plasma and large intestine of patients with colorectal carcinoma before and after surgery. *J Pineal Res* 1999;27:164-169.

INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES

La hormona melatonina, producida durante la noche por la glándula pineal, juega un importante papel en la regulación del ciclo sueño-vigilia^{1,2}.

Su producción en el ser humano es inhibida por la luz. Ésta penetra en el ojo llegando a fotorreceptores de la retina implicados en la regulación de la biosíntesis de melatonina³ que transmiten esta información a la epífisis a través del núcleo supraquiasmático del hipotálamo⁴ mediante nervios simpáticos.

Los niveles plasmáticos de melatonina en humanos durante la vigilia se encuentran en el rango de 5 a 20 pgr/ml entre las 12:00 h y las 20:00 h. Durante el sueño estos niveles pueden exceder los 55 a 90 pgr/ml, sin embargo existe una marcada variación interindividual⁵ siendo su concentración dependiente de la edad^{6,7,8}.

El más potente supresor de la liberación nocturna de esta hormona es la luz⁹ y dentro del espectro visible la que está en el rango del azul (500-520 nm). Las radiaciones ionizantes con frecuencias extremadamente bajas^{10,11} (aproximadamente 60 Hz) parecen poder alterar su biosíntesis. También el ejercicio físico puede modificar su producción aunque el mecanismo es desconocido¹².

La vida media de la melatonina en el plasma humano es aproximadamente de 47 min y existen patrones alterados en su liberación en trastornos del sueño¹³, síndrome “Jet-Lag”^{14,15}, depresión^{16,17,18}, esquizofrenia^{19,20}, embarazo²¹, amenorrea de origen hipotalámico²², anorexia nerviosa^{23,24}, algunas formas de cáncer²⁵ y pubertad²⁶.

Se han realizado estudios sobre la potencia narcótica y sedante de la melatonina y análogos en los que parece demostrarse cierta capacidad hipnótica^{1,27,28,29}.

Otro efecto importante es su actividad como antioxidante con capacidad de proteger al ser humano de los radicales libres^{30,31}. Así, el daño en el DNA producido por la exposición de animales a carcinógenos químicos o radioactivos es reducido por la coadministración de melatonina. La generación de cataratas es una consecuencia del ataque sobre las macromoléculas lenticulares por parte de los radicales libres. La inyección diaria de melatonina en ratas recién nacidas previene su producción. Otras sustancias con capacidad de lesión tisular mediante radicales libres, pueden ser neutralizadas por la hormona en cuestión³² y parece ser que también puede corregir ciertos estados de inmunodeficiencia^{33,34} y tumorales^{35,36}.

Es bien conocida su acción antigonadotrópica, ya que en pinealectomizados se produce un incremento en el tamaño de los genitales externos y una aceleración en el crecimiento^{37,38,39}.

Recientemente existen datos que sugieren que también actúa como activador inmunológico^{40,41} sobre las células T-helper y de forma directa en la proliferación

linfocitaria. Este último efecto lo realiza posiblemente uniéndose a receptores de alta afinidad para la hormona localizados en los esplenocitos, que estimulan la producción de IL-2 e IL-1b originando un incremento de la inmunidad celular⁴². Además, las linfoquinas y las hormonas tiroideas, así como algunas hormonas sexuales^{43,44} pueden regular la síntesis de melatonina en la pineal⁴⁵.

La melatonina puede estar implicada en el mecanismo de acción de sustancias con capacidad hipnótica que se utilizan en anestesia. Asimismo, esta hormona podría actuar como mediador de otros fármacos hipnóticos cuyo lugar de acción es aún desconocido.

Es de candente actualidad, por su uso indiscriminado en la población general, sin tener en cuenta la posibilidad de reacciones adversas. Esto ha llevado a la restricción de su empleo.

Por todo ello, parece de interés la profundización en el estudio de una hormona de síntesis endógena de la cual aún no conocemos todas sus funciones y que administrada de forma exógena, podría emplearse como fármaco aprobado por las distintas comisiones internacionales.

1.2. ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA PINEAL

La glándula pineal o epífisis es un órgano cónico en forma de piña (de ahí su nombre), de color gris y con dimensiones de 5-8 mm de longitud y de 3-5 mm en el punto de mayor anchura. Forma parte del epítalamo y surge del techo del tercer ventrículo, bajo el extremo posterior del cuerpo calloso, estando conectada por un tallo a las comisuras posterior y habenuar. En el tallo existen fibras nerviosas, pero al parecer no llegan a la glándula. El estroma pineal contiene neuroglia y células parenquimatosas (pinealocitos) que tienen algunos caracteres que sugieren una función secretora para ellas⁴⁶. En los animales jóvenes y en los lactantes, la pineal es grande y las células tienden a agruparse en alvéolos. Comienza a involucionar antes de la pubertad, y en el hombre aparecen en el tejido pequeñas concreciones de fosfatos y carbonatos de calcio (acérvulo o arena pineal)⁴⁷, no pareciendo existir relación entre el grado de calcificación y la función glandular⁴⁸. La epífisis a semejanza de otros órganos circunventriculares tiene capilares muy fenestrados y su inervación procede del ganglio cervical craneal⁴⁹, llegando a ésta por dos caminos; acompañando al plexo nervioso a lo largo de la arteria cerebral posterior, y formando unos finos nervios (derecho e izquierdo), llamados coronarios, que separándose del plexo nervioso llegan al vértice o ápex de la epífisis, por la tienda del cerebelo⁵⁰. A continuación se refleja una representación esquemática de su disposición anatómica⁵¹:

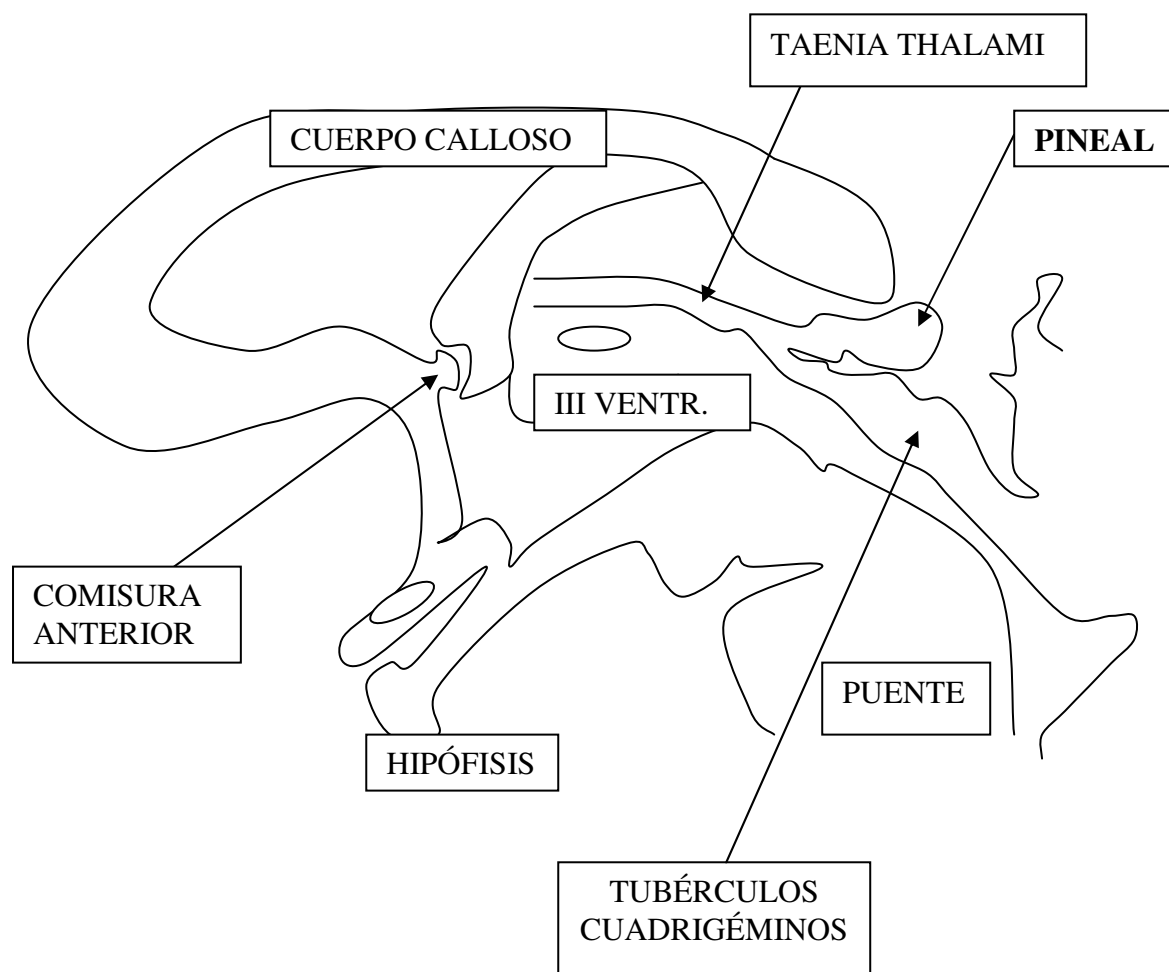


FIG. 1. CORTE SAGITAL DE TALLO CEREBRAL MOSTRANDO LAS RELACIONES DE LA PINEAL

1.3. RESUMEN HISTÓRICO

1.3.1. Historia de la Anestesia General

Pese a que el ánimo de calmar el dolor subyace en todos los actos médicos realizados desde el principio de la historia, las técnicas y procedimientos han necesitado un largo proceso de evolución.

La historia de la anestesia propiamente dicha comienza, según relata Calverley, con la utilización por primera vez del dietil-éter con fines anestésicos por William T.G. Morton en el mes de Octubre de 1846. Este compuesto ya era conocido desde la antigüedad, pero será este autor quien advierta su versatilidad para aportar a la cirugía un cierto grado de narcosis, analgesia y mínimas repercusiones hemodinámicas⁵².

El protóxido de nitrógeno (N_2O), descubierto por Joseph Priestly (1733-1804) no sería introducido en la clínica hasta su utilización por Humphry Daby (1778-1829)⁵³. Aunque el uso del N_2O como agente único se demostró insuficiente para el acto quirúrgico, su empleo como coadyuvante en los actos anestésicos se ha mantenido en la rutina diaria hasta nuestros días.

El cloroformo fue introducido por Simpson, y desarrollado en su utilización clínica por John Snow, probablemente el primer anestesiólogo de la historia. Su labor no sólo se limitó al uso clínico, también diseñó sistemas de inhalación de éter y cloroformo,

comparando sus efectos en distintos animales y anticipando el concepto de concentración alveolar mínima (CAM)⁵⁴.

Otra figuras como Clover y Hewitt continuaron su trabajo en el campo de la anestesia inhalatoria, el ciclopropano se introdujo en la clínica tras su descubrimiento accidental en 1929, utilizándose con profusión durante los siguientes treinta años, hasta el advenimiento de los agentes halogenados que anulan los riesgos de explosión existentes con los primeros anestésicos.

El empleo de agentes intravenosos se implanta prácticamente al final del siglo pasado y principio del presente (según referencias de Calverley y Smith), siendo el hidrato de cloral primero, la morfina y escopolamina después, y ya en el siglo XX el tiopental de la mano de Lundy, los que han posibilitado la inducción intravenosa en el campo de la anestesia general⁵⁵.

Por último, los relajantes musculares derivados del curare, alcaloide de plantas tropicales, son utilizados en clínica a principios del siglo XX tras su purificación y exhaustivos trabajos de investigación de sus acciones, siendo la gallamina el primer preparado comercial que apareció en 1948.

Desde los primeros agentes anestésicos hasta el uso de fármacos como el midazolam, propofol, rocuronio o remifentanilo se ha avanzado mucho en el camino para conseguir hacer de la anestesia un procedimiento seguro, que proporcione al paciente una

situación confortable, libre de la experiencia traumática del dolor, y de la respuesta vegetativa que acompañaban a la cirugía hace dos siglos.

1.3.2. Historia de la Anestesia Intrarraquídea

El término anestesia intradural o intrarraquídea fue introducido por Corning en 1885. Su intención era realizar una inyección directa medular de cocaína a través de una aguja hipodérmica⁵⁶. La primera punción a nivel lumbar fue realizada por Quincke⁵⁷ y 8 años más tarde Bier aplicó lo que hoy se conoce como anestesia intradural, siendo puesto en boga su empleo por Théodore Tuffier. La idea de administrar soluciones hiperbáricas para obtener un mejor control sobre la difusión intratecal se debe a Arthur E. Baker y el uso de las hipobáricas a Pitkin y Etherington-Wilson. Posteriormente surgieron las diluciones cuasiisobáricas y la aplicación de nuevos anestésicos locales como la estovocaína (W.G. Hepburn), la procaína y la tetracaína (L.F. Sise)⁵⁸. Por último la bupivacaína fue sintetizada por Ekstam en 1957 e introducida en la clínica por Widman en 1963.

1.3.3. Historia de la Glándula Pineal

La glándula pineal o epífisis, que se encuentra normalmente calcificada en el adulto, es una estructura neuroendocrina central relacionada con la cronobiología⁵⁹ y que durante

siglos ha sido un misterio en cuanto su función⁶⁰. La primera descripción de este órgano se debe a Herófilo de Alejandría en el siglo III a.c. Posteriormente Galeno en el siglo II d.c. en su tratado “Utilidad de las Partes del Cuerpo” la define como glándula y soporte para la vasculatura de vecindad. Para René Descartes (1596-1650) es el sitio de expresión del alma en su publicación postmortem de 1664, Tratado del Hombre⁶¹. También en el siglo XVII, T. Wharton escribe sobre la epífisis considerándola una válvula entre el III y IV ventrículo cerebrales⁶², y J. Cousin en sus disertaciones en la Escuela de Medicina de París (año 1641) habla de ella como la sede del “Sensus Communis”^{63,64,65,66}. En 1695 Ridley en su libro Anatomía del Cerebro propone a la pineal como una estructura de carácter linfático que recoge la linfa de los conductos que rodean a los ventrículos cerebrales.

Muchos otros autores (S. Hipólito, Costa Ben Luca, Ibn al-Jazzar, A. Vesalio, J. Fernel, J. Soury, etc.)⁶⁷, han intentado a lo largo de toda la historia discernir su misión, pero no es hasta el siglo XX, en la década de los setenta, cuando R. Reiter⁶⁸ indica su función central.

En la actualidad, la función precisa de la glándula no es conocida con detalle, ya que la pineal, aunque la principal hormona que libera es la melatonina, produce una gran variedad de hormonas entre las que se incluyen: serotonina, noradrenalina, histamina, dopamina, somatostatina, vasopresina⁶⁹, etc.

1.3.4. Historia de la Melatonina

La hormona melatonina, cuyo precursor es la serotonina, fue aislada por A. Lerner de la pineal de ganado vacuno en 1958⁷⁰. Un año más tarde, Lerner demuestra la producción de esta hormona por la epífisis^{71,72,73,74} y en 1960 J. Axelrod^{75,76,77,78,79,80} describe la respuesta de la pineal liberando melatonina en función de la cantidad de luz. En 1978, Cordell la clasifica como un alcaloide indólico derivado de la triptamina, un año después se relaciona con los ritmos circadianos^{81,82} y en 1984 con la producción de sueño^{83,84,85}. Su metabolismo a partir del aminoácido triptófano es detallado gracias a autores como Dubocovich (1988)⁸⁶, Hashizume (1991) y Tedesco et al. en 1994⁸⁷, mientras que en 1995 se observa que esta sustancia es contenida en zanahorias, tomates y nueces^{88,89}, y producida en tejidos extrapineales como la retina^{90,91} tanto en humanos como en otros mamíferos. Finalmente en 1996, García-Patterson recoge su capacidad de producción lumínica al actuar sobre los órganos fotóforos de algunos anfibios.

En la actualidad, tras su producción sintética y empleo previo en investigación veterinaria, la melatonina, desde el punto de vista de la comercialización por parte de la industria farmacéutica, es una sustancia pendiente de resultados de estudios toxicológicos y clasificada por la FDA (Food and Drug Administration, USA) como una droga huérfana, sin su aprobación para el empleo en humanos.

1.3.5. Historia de las Benzodiazepinas

El efecto hipnosedante de las benzodiazepinas se descubrió accidentalmente⁹². Tras sintetizarse el clordiazepóxido por Sternbach en 1955, se descubrió su efecto letárgico en el ratón en 1957, comercializándose en 1960 por sus propiedades hipnóticas y amnésicas. Fueron creándose nuevas benzodiazepinas, pero no fue hasta 1976 cuando Fryer y Walser sintetizaron el midazolam, la primera hidrosoluble y producida fundamentalmente para ser empleada en anestesia⁹³.

El receptor benzodiazepínico se describió por primera vez en Milán en 1971, y en 1977 receptores específicos para las benzodiazepinas cuando se descubrió que los ligandos interaccionaban con un receptor central⁹⁴.

1.3.6. Historia del Propofol

El 2,6 diisopropilfenol surgió a principios de los años setenta como consecuencia de la investigación de los derivados sustituidos del fenol con propiedades hipnóticas⁹⁵. El propofol se utilizó en la inducción y mantenimiento anestésico, así como en sedación, tras los estudios clínicos de Kay y Rolly en 1977⁹⁶. Inicialmente y debido a su liposolubilidad,

el preparado comercial de propofol venía diluido en Cremophor, el cual originaba graves reacciones anafilácticas⁹⁷, por lo que se abandonó su utilización clínica. Su empleo se generaliza en anestesia, como complemento a la anestesia regional y para sedaciones prolongadas en las unidades de vigilancia intensiva, tras su emulsificación con intralipid, carente de este tipo de efectos deletéreos.

1.4. ANESTESIA GENERAL

La anestesia general es un estado inducido farmacológicamente en el que existe una ausencia de percepción de todas las sensaciones, con hipnosis, amnesia, relajación neuromuscular y protección vegetativa⁹⁸. La profundidad anestésica apropiada para los procedimientos quirúrgicos puede conseguirse con gran variedad de drogas, generalmente combinadas⁹⁹. Las vías fundamentales de administración son la inhalatoria y la intravenosa.

1.4.1. Inhalatoria

Los agentes anestésicos inhalatorios son gases como el protóxido de nitrógeno o líquidos volátiles como los agentes halogenados. Éstos se caracterizan por una entrada en el pulmón en la ventilación, regulada mediante un sistema de dosificación denominado vaporizador y que conectado al circuito inspiratorio del respirador, permite la administración del fármaco a una concentración conocida¹⁰⁰.

Existen diversas drogas inhalatorias como son el N₂O, isoflurano y sevoflurano que pasan rápidamente a los tejidos produciéndose una inducción hipnótica rápida¹⁰¹. Entre sus efectos a nivel sistémico están la depresión de la conciencia¹⁰², las propiedades analgésicas¹⁰³ y de relajación muscular^{104,105}.

A pesar de ser los agentes que se aproximan más al anestésico ideal, se suelen administrar en combinación con otros o como coadyuvantes del mantenimiento anestésico.

1.4.2. Intravenosa

Los anestésicos intravenosos aportan a la actividad clínica una mejor dosificación y una inducción suave, sin los efectos irritantes en la vía aérea de los halogenados, disminuyendo la producción de contaminación ambiental.

Sobre el clásico modelo de Woodbridge¹⁰⁶ no existe agente único que produzca hipnosis, amnesia, analgesia y bloqueo motor, sin embargo la asociación de diversos fármacos permite la inducción anestésica de forma rápida, segura y con mínimos efectos indeseables.

Los agentes hipnóticos¹⁰⁷ van desde el tiopental, hasta el propofol, pasando por el etomidato, la ketamina, y el midazolam¹⁰⁸.

Los derivados opiáceos¹⁰⁹ poseen efectos hipnosedantes y sobre todo son empleados para bloquear la respuesta frente al dolor. La meperidina, el fentanilo, alfentanilo y remifentanilo han sustituido a la morfina en el uso clínico por su mayor potencia, menor duración de acción y menor efecto cardiovascular.

Por último, los modernos relajantes musculares¹¹⁰, atracurio, vecuronio y rocuronio, aportan una dosificación cómoda con mínimo efecto de recurarización por su corto tiempo de acción.

A este apartado debemos añadir el avance en el campo de la anestesia intravenosa total, facilitado por los nuevos sistemas de infusión computerizado, que permiten la administración continua de las drogas para el mantenimiento anestésico durante toda la intervención^{111,112}.

1.5. ANESTESIA REGIONAL

La anestesia regional consiste en la administración en la proximidad de un plexo nervioso de anestésicos locales, opiáceos u otros fármacos adyuvantes, como los agonistas α , con objeto de evitar la nocicepción¹¹³.

Los anestésicos locales van a provocar un bloqueo de la conducción nerviosa¹¹⁴ tanto a nivel sensitivo, como motor y neurovegetativo. El efecto es dependiente de la altura alcanzada por el bloqueo, de la concentración, el volumen y el tipo de agente administrado¹¹⁵.

Dentro de este tipo de fármacos, se emplean unos u otros en función de su potencia, latencia, toxicidad y tiempo de duración, siendo en la actualidad los más empleados la lidocaína, mepivacaína, prilocaína y bupivacaína¹¹⁶. En la anestesia regional intrarraquídea pueden emplearse estas sustancias en forma hipo, iso o hiperbara. La baricidad refleja la relación de densidad de la formulación galénica de estas drogas respecto al líquido cefalorraquídeo¹¹⁷. Una formulación hiperbárica es más densa que éste y por tanto tiende a difundir a favor de la gravedad, mientras que en el caso de las soluciones hipobáricas ocurriría el fenómeno inverso¹¹⁸. El empleo de un tipo u otro dependerá del tipo de cirugía, la posición del paciente en la mesa de quirófano y el estado de salud que presente éste previo a la intervención¹¹⁹.

Los opiáceos se aplican para potenciar a los anestésicos locales y disminuir su dosificación¹²⁰ y viceversa¹²¹. La meperidina, metadona, morfina y el fentanilo se administran en función de su duración y lipo/hidrosolubilidad¹²² para obtener los efectos deseados en función del tipo y grado de analgesia/anestesia requerida^{123,124}.

Entre los α agonistas, la clonidina¹²⁵ es el más utilizado y siempre con objeto de potenciar a los anestésicos locales, poseyendo además capacidad de provocar sedación¹²⁶.

1.6. SEDACIÓN INTRAVENOSA

La sedación intravenosa se define como el conjunto de medios farmacológicos destinados a una mejora de las condiciones físicas y psíquicas del paciente en unidades de vigilancia de críticos, y para facilitar técnicas diagnósticas y terapéuticas¹²⁷.

En anestesia locorregional, la sedación tiene como finalidad mejorar el nivel de confort de los pacientes durante el acto quirúrgico.

Clásicamente, las benzodiacepinas han sido los fármacos más empleados por su capacidad de producir ansiolisis, sedación, y algunas de ellas, como el midazolam, amnesia. En el momento actual, otros agentes hipnótico-sedantes como el propofol, presentan propiedades que les permiten ser una alternativa válida, e incluso superior a las benzodiacepinas¹²⁸.

Existen diversas escalas para la monitorización del grado de profundidad de sedación (Yate, Rosen, Cambridge), que siguen los mismos principios, aunque ninguna es ideal¹²⁹. La más utilizada es la escala de Ramsey que se representa en el cuadro siguiente:

CUADRO 1. ESCALA DE RAMSEY

GRADO	RESPUESTA
1	AGITACIÓN, ANSIEDAD
2	CALMADO, ORIENTADO
3	RESPUESTA A ÓRDENES
4	DORMIDO, (responde a estímulos)
5	DORMIDO, (respuesta débil)
6	SIN RESPUESTA AL DOLOR

En la escala de Ramsey los grados que se aproximan más a un estado de sueño o hipnosis natural, serían los correspondientes al 4 y 5.

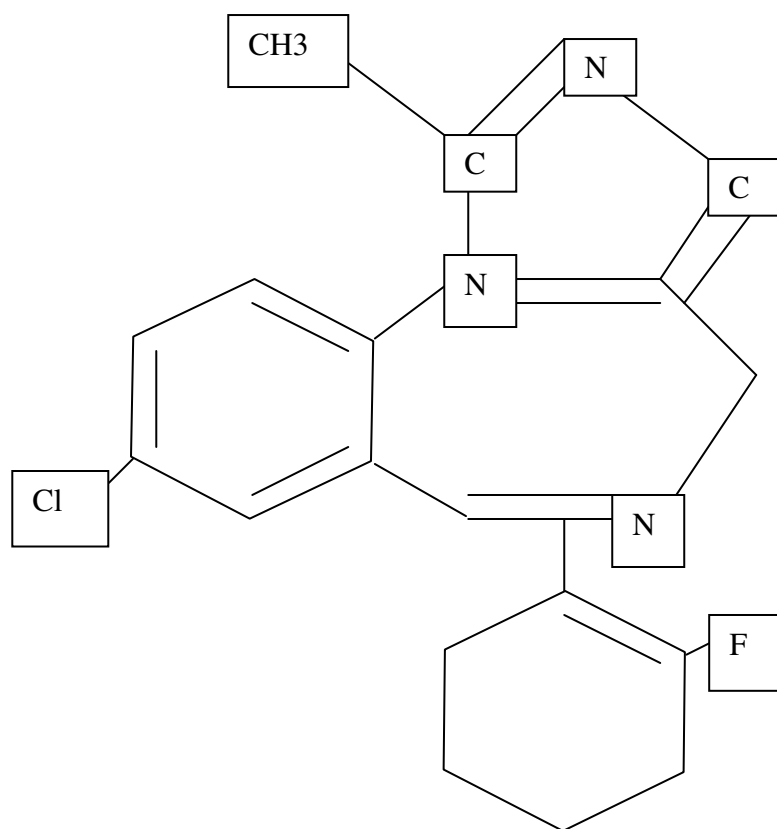
En cuanto a las modalidades de administración de sedación intravenosa son tres: bolo, perfusión intermitente y perfusión continua, siendo esta última la que presenta niveles del fármaco más estables, ya que se basa en la aplicación de una velocidad constante mediante una bomba de infusión^{130,131}.

1.7. MIDAZOLAM

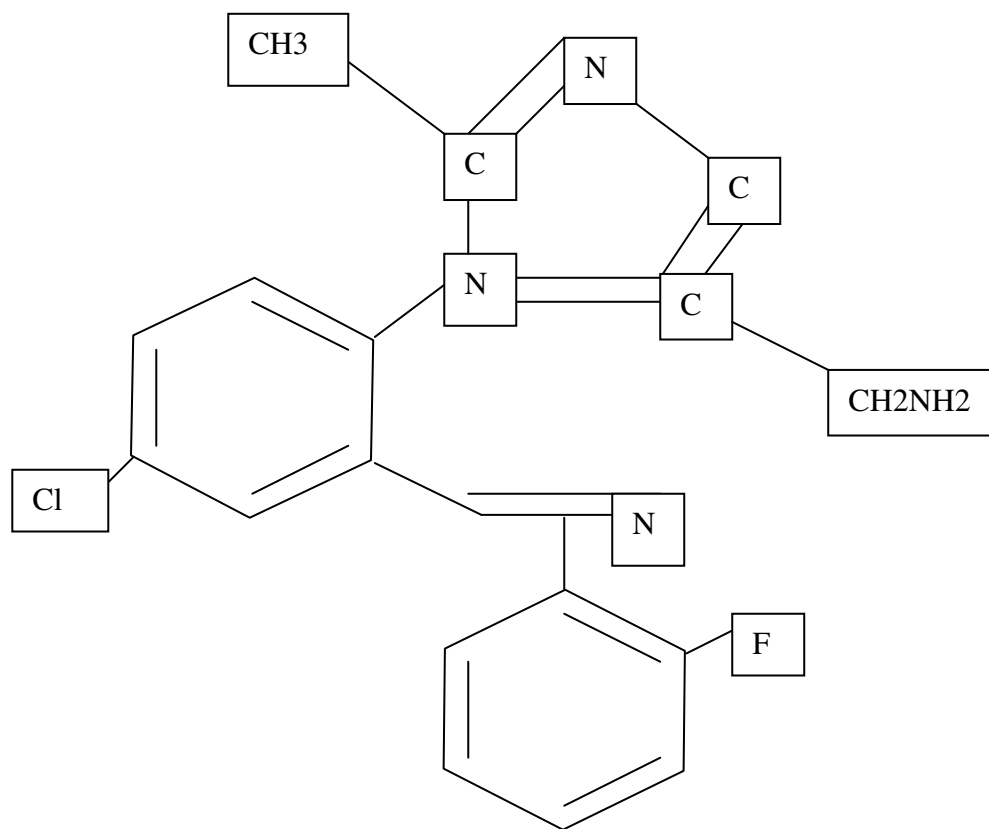
Es un derivado imidazólico con propiedades hipnóticas, sedantes, ansiolíticas, amnésicas, anticonvulsivantes y relajantes musculares de origen central. Tras su administración intravenosa produce, según la dosis, en 2 a 3 minutos, primero sedación y disminución del conocimiento, y posteriormente sueño.

Al estar formulado para su comercialización en un medio ácido tamponado (pH menor a 4) es hidrosoluble, ya que mantiene abierto un anillo aromático de su estructura imidazólica, pero es muy liposoluble a pH fisiológico (pH mayor a 4), debido al cierre de este anillo, aumentando su volumen de distribución.

Por tanto su estructura química se modifica con el pH, lo que se refleja en las siguientes figuras:



**FIG. 2. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL MIDAZOLAM A
PH MAYOR A 4**



**FIG. 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL MIDAZOLAM A
PH MENOR A 4**

Las benzodiacepinas tienen un mecanismo de acción común¹³² potenciando al neurotransmisor ácido gamma amino butírico (GABA). Inactivan a la proteína de membrana gabamodulina que inhibe la acción del neurotransmisor disminuyendo sus puntos de unión y afinidad por el receptor. Tanto el receptor benzodiacepínico como el del GABA y la gabamodulina, formarían parte de una única estructura funcional¹³³. Facilitando la acción del GABA se favorece el influjo intracelular de cloro, la hiperpolarización y por tanto, la inhibición de la transmisión nerviosa en el sistema nervioso central (SNC).

Concretamente existen dos subtipos de receptores para el GABA, el GABA_A y el GABA_B, actuando tanto benzodiacepinas como barbituratos favoreciendo la actividad del neurotransmisor sobre el GABA_A, pero las primeras interaccionan aumentando la frecuencia de apertura del canal del cloro, mientras los segundos aumentan la conductancia a éste por incremento del tiempo de apertura de dicho canal¹³⁴.

No obstante, tanto los barbitúricos como las benzodiacepinas son capaces de ejercer una amplia gama de acciones en relación con la dosis y por tanto, se pueden aceptar múltiples y diferentes mecanismos de acción de estos fármacos en el SNC¹³⁵. En la figura 4 se representa un modelo de receptor del GABA:

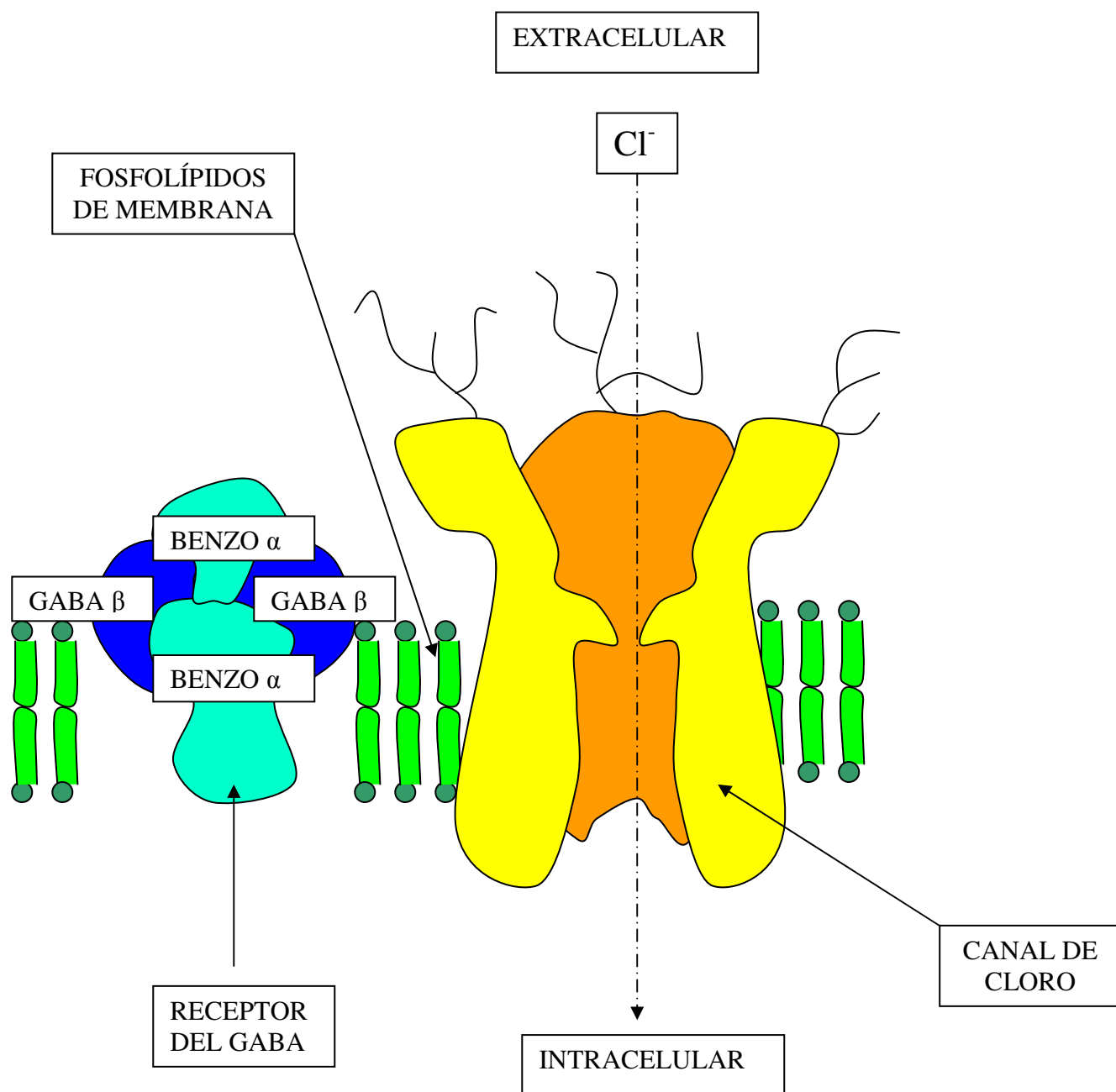


FIG.4. MODELO DE RECEPTOR DEL GABA

Para sedación profunda la dosis recomendada de midazolam en perfusión continua intravenosa (i.v.) es de 0,05-0,2 mg/kg/h¹³⁶, recordando la obligatoriedad de monitorización adecuada ante la posibilidad de depresión respiratoria¹³⁷.

Dadas sus características farmacocinéticas¹³⁸, el midazolam es de todas las benzodiacepinas la más apropiada para su empleo en perfusión continua i.v. Por sus propiedades hipnóticas y amnésicas, ha demostrado sus ventajas como fármaco empleado para sedación en las técnicas de anestesia regional y en unidades de cuidados intensivos, siendo de mayor utilidad que otros fármacos^{139,140}.

1.8. PROPOFOL

Es un alquilfenol (2,6 diisopropilfenol) con propiedades hipnóticas, muy liposoluble y por tanto, insoluble en agua. Se caracteriza por producir sueños agradables y su presentación es en forma de un líquido blanco lechoso que puede ser doloroso a la inyección. La estructura química del propofol es la siguiente:

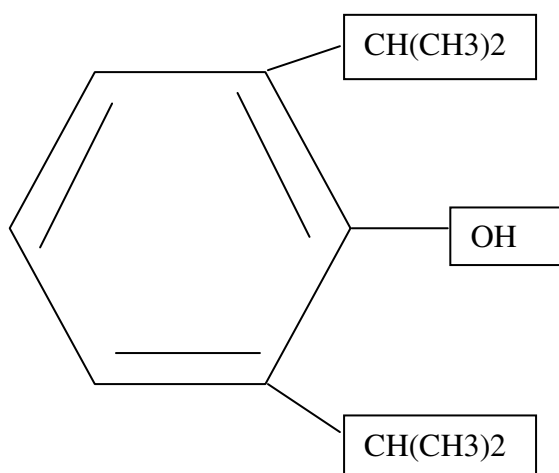


FIG. 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL PROPOFOL

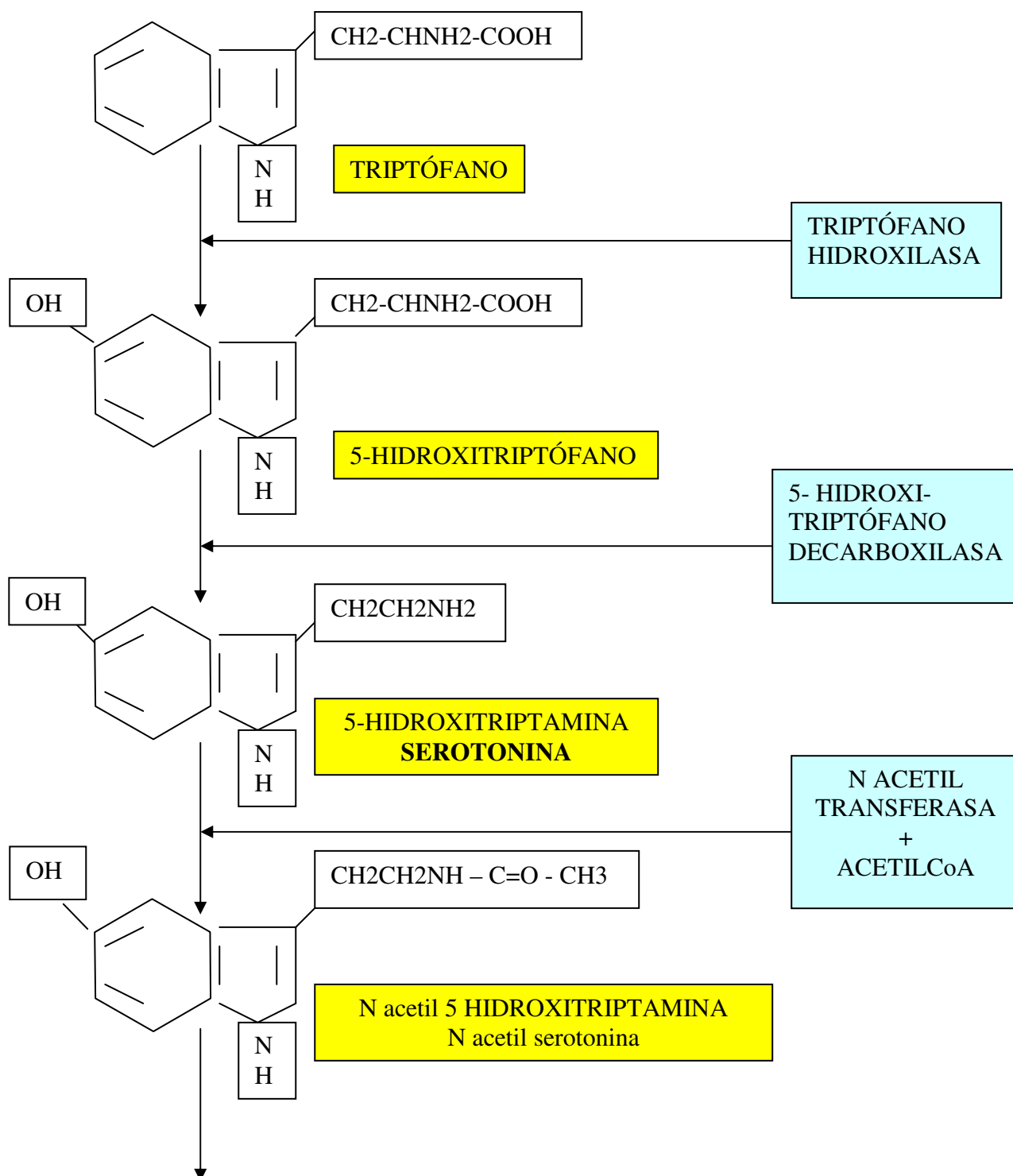
Su mecanismo de acción es a través de la potenciación del neurotransmisor GABA¹⁴¹ y a dosis subanestésicas (25-75 µg/kg/min., i.v.)¹⁴² produce sedación y amnesia.

El propofol, en perfusión continua, proporciona un nivel de sedación fácilmente titulable y una rápida recuperación después de finalizar la perfusión^{143,144,145}. Durante el periodo de perfusión con propofol los pacientes permanecen amnésicos. En comparación con la sedación mantenida con midazolam, la sedación con propofol proporciona un control igual o mejor, y una recuperación más rápida¹⁴⁶.

1.9. MELATONINA

En la glándula pineal, la serotonina es convertida en melatonina tras N-acetilación y 5-metilación, aunque algo de melatonina es producida en otras zonas del cuerpo¹⁴⁷. La síntesis de esta hormona se ve favorecida en la oscuridad y disminuye con la exposición a la luz, siendo regulado este ritmo circadiano por los nervios simpáticos de la epífisis (nervi coronarii), ya que controlan la actividad de la N- acetiltransferasa que cataliza en la glándula la formación del indol¹⁴⁸. La descarga simpática es estimulada por las fibras nerviosas retino-hipotalámicas y los núcleos supraquiasmáticos. Es bien conocido que la lesión de estos últimos rompe el ritmo circadiano de producción de ACTH y melatonina¹⁴⁹. La noradrenalina liberada en las terminaciones nerviosas simpáticas actúa sobre receptores β -adrenérgicos, siendo el mediador el AMP-c, e incrementando la actividad de la enzima, y por tanto, aumentando la síntesis y secreción de la hormona¹⁵⁰.

Su degradación a 6- Hidroximelatonina se realiza en el hígado, excretándose en orina fundamentalmente en forma de 6- Sulfatoximelatonina (80-90%). Ver representación esquemática en las siguientes páginas.



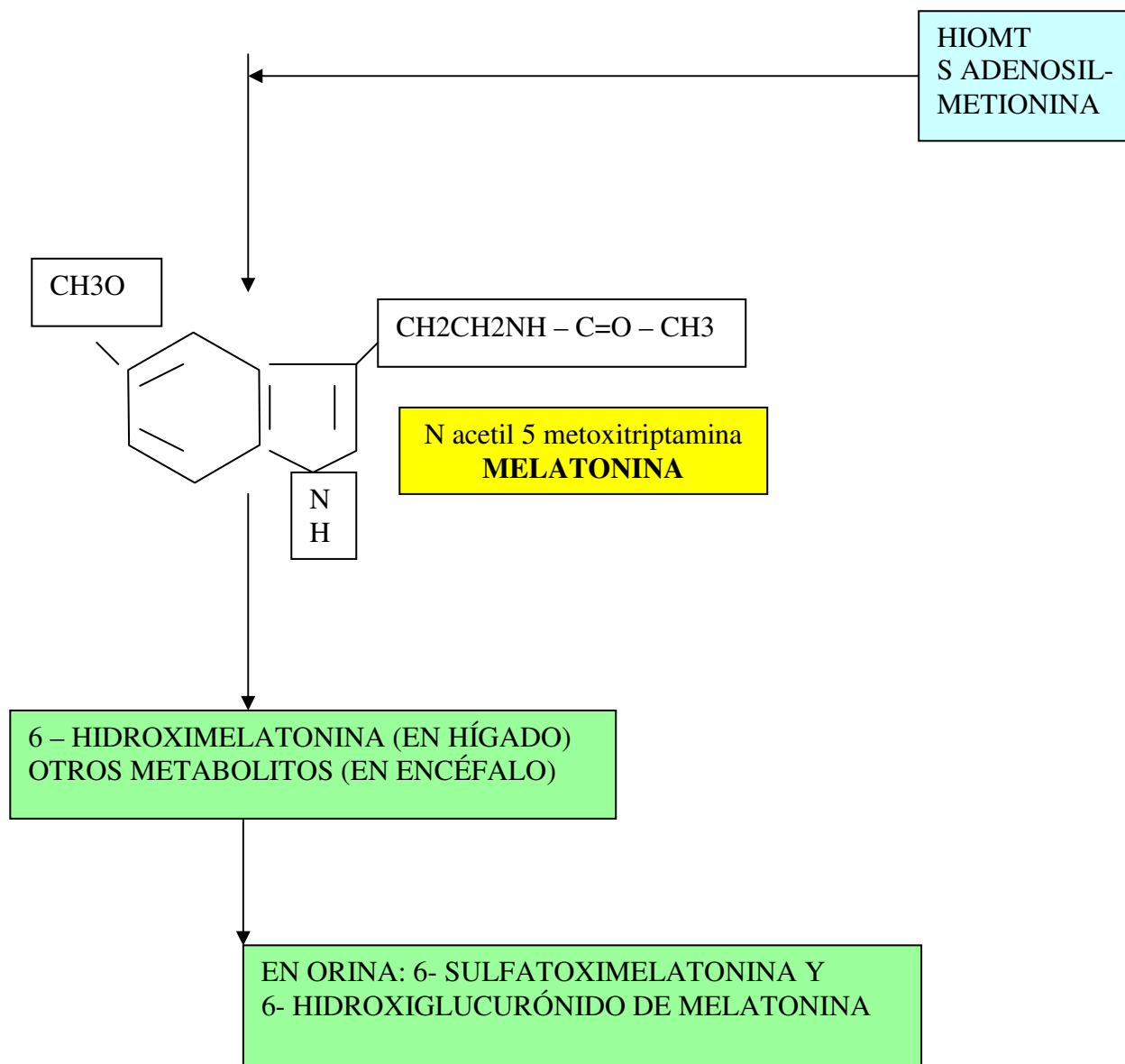


FIG. 6. BIOSÍNTESIS DE LA MELATONINA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La melatonina puede estar implicada en el mecanismo de acción de sustancias con capacidad hipnótica que se utilizan en anestesia. Asimismo, esta hormona podría actuar como mediador de otros fármacos hipnóticos cuyo lugar de acción es aún desconocido.

La hormona melatonina liberada por la glándula pineal, parece tener un claro efecto sobre el sueño natural. Nuestros objetivos han sido:

1. Valorar su influencia en el sueño artificial realizando un estudio observacional, prospectivo y randomizado en humanos sometidos a hipnosis con midazolam o propofol.
2. Observar los posibles cambios en la concentración sérica de la hormona de síntesis endógena melatonina en humanos durante la hipnosis anestésica.
3. Evaluar la relación causa-efecto entre la administración de fármacos hipnóticos y los cambios en la concentración plasmática de melatonina.

PACIENTES Y MÉTODO

3.PACIENTES Y MÉTODO

3.1. MÉTODO DE ESTUDIO

3.1.1. Ámbito del estudio

Servicio de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares, con un área de influencia de 300.000 habitantes, número de intervenciones programadas de 6.500/año y urgentes de 3.500/año, para la realización de las técnicas anestésicas, monitorización y quirófanos.

Departamento de Especialidades Médicas de la Facultad de Medicina de Alcalá de Henares, Universidad de Alcalá, Madrid, para ubicación física de material e instrumental empleados.

3.1.2. Sujetos de estudio

- Realización de anestesia intrarraquídea (set espinal, 27-G Whitacre, Braun) con bupivacaína al 0,5% hiperbara, en dosis de 15 mg, sin sedación.
- Realización de anestesia intrarraquídea (set espinal, 27-G Whitacre, Braun) con bupivacaína al 0,5% hiperbara, en dosis de 15 mg, con midazolam de 0,05-0,1 mg/kg/h en perfusión continua i.v.

- Realización de anestesia intrarraquídea (set espinal, 27-G Whitacre, Braun) con bupivacaína al 0,5% hiperbara, en dosis de 15 mg, con propofol 3-4 mg/kg/h en perfusión continua i.v.

3.1.3. Criterios de inclusión

Pacientes de 18-50 años (ya que tanto la pubertad como la senectud pueden provocar trastornos que podrían interferir en los valores de la hormona en estudio) y de ambos sexos, ASA-I (sin patología concomitante), que fueron sometidos a cirugía traumatológica programada de miembros inferiores entre las 12:00 h y las 17:00 h.

La duración máxima estimada de las intervenciones fue de 2 h. La sedación a nivel de hipnosis fue realizada con midazolam o propofol y los pacientes incluidos en el estudio no recibieron ningún tipo de premedicación.

3.1.4. Criterios de exclusión

Menores de 18 años y mayores de 50 años. Hipersensibilidad a alguno de los fármacos utilizados en este trabajo. Empleo peroperatorio de algún principio activo distinto a los manejados en el estudio. Embarazo, amenorrea, trastornos mentales, trastornos del sueño previos (incluido el día previo a la intervención), trastornos endocrinológicos. La recogida de todos estos datos se hizo mediante anamnesis y revisión del historial clínico

3.1.5. Obtención y recogida de datos

➤ Anamnesis, tanto en el antequirófano como en la entrevista anestésica previa a la intervención, para inclusión/exclusión de pacientes en el estudio.

El día de la intervención se volvió a interrogar por ingesta de fármacos y/o alteraciones en el ritmo de sueño como consecuencia del estrés por la operación, descartándose aquellos que así lo refirieron.

➤ Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes, en el que se les advirtió que la técnica anestésico-quirúrgica no iba a variar en función de su introducción en los diferentes grupos, y que se les solicitaba su permiso para no utilizar premedicación y para la realización de las distintas extracciones sanguíneas.

➤ Aleatorización de los pacientes en los distintos grupos.

➤ Los parámetros de monitorización fueron los habituales para este tipo de procesos, es decir, pulsioximetría, electrocardiografía continua y presión arterial incruenta cada 5 min, para el registro de posibles efectos indeseables propios de la cirugía o del acto anestésico.

➤ Extracción hemática a los 10 y 60 minutos tras la hipnosis, a los 90 minutos tras concluir la intervención, así como una muestra basal entre las 12:00 h y las 20:00 h en la consulta preanestésica. Todas las muestras fueron centrifugadas, almacenadas a -20° C y procesadas por duplicado.

➤ Valoración clínica del nivel de conciencia, recogiendo las muestras cuando el paciente se encontraba en un grado 4 ó 5 en la escala de Ramsey. Se observaron:

- Respuesta a estímulos verbales y dolorosos.
- Reflejo palpebral y movimientos oculares.
- Frecuencia cardiaca.
- Volumen corriente en respiración espontánea.

3.1.6. Registro de efectos indeseables y/o complicaciones

Tras terminar la intervención y previa retirada de la perfusión para sedación, los pacientes pasaron a la unidad de reanimación, donde conservaron el mismo nivel de monitorización que en el quirófano, no recogándose ningún caso que presentase efecto adverso y/o complicación alguna.

3.1.7. Instrumental

- Administración de anestesia intratecal (set espinal, 27-G Whitacre, Braun).
- Kit para ELISA IBL, Hamburgo, Alemania (Ref. Cat. RE 54021).
- Centrifugadora (HETO VR-1).
- Centrifugadora evaporadora con trampa de frío (HETO CT-110).
- Lavador harvester (INOTECH IH-110).
- Lector de placas microtiter ELISA (MEDGENIX EASIA READER I.L.).

- Monitorización hemodinámica, electrocardiografía y pulsioximetría (Dräger).

3.1.7.1. Principios del test

La detección de melatonina por ELISA es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de melatonina en plasma y suero previa extracción de la misma. El procedimiento de ensayo sigue los principios básicos para los inmunoensayos competitivos, es decir, existe una competición entre el antígeno unido y no unido a biotina por un número fijo de lugares de unión con el anticuerpo. La cantidad de antígeno con biotina unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración a determinar en la muestra. Cuando el sistema está en equilibrio, el antígeno con biotina sobrante es eliminado por lavado, mientras que el antígeno con biotina unido al anticuerpo es determinado gracias al empleo de antibiotina unida a fosfatasa alcalina, siendo su sustrato el p-nitrofenil fosfato. La cuantificación se realiza comparando la actividad enzimática de las muestras a determinar con una curva de respuesta preparada por estándares cuya cantidad de melatonina es conocida.

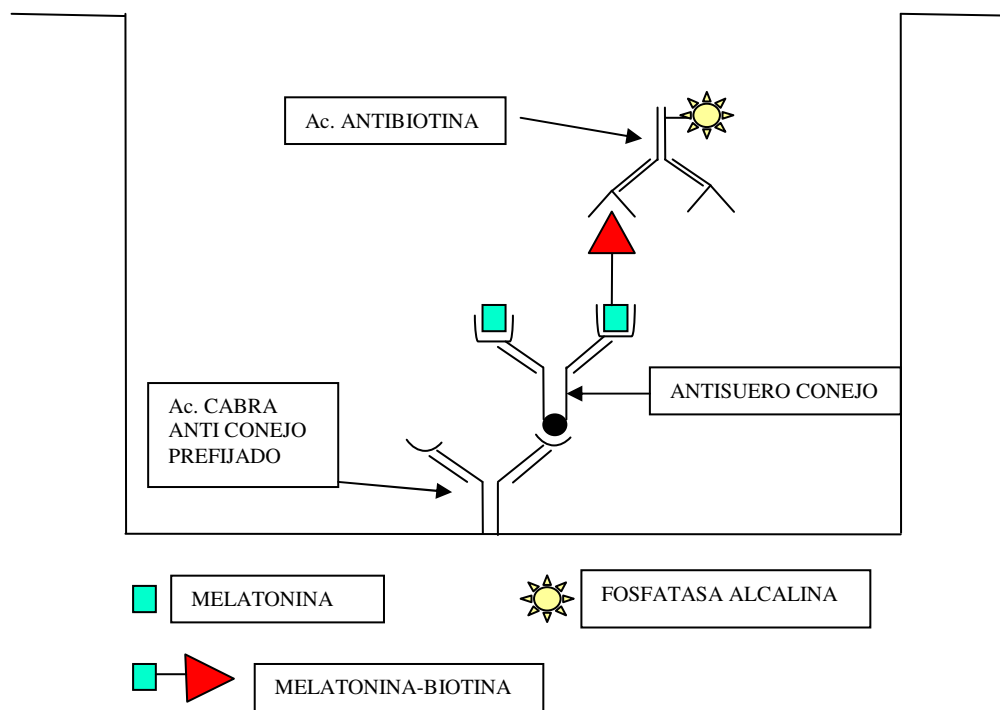


FIG. 7. POCILLO DE PLACA MICROTITER CON ESQUEMA DEL ENSAYO

3.1.7.2. Procedimiento de extracción

Inicialmente, todas las muestras con lectura superior al estándar con mayor valor, se diluyeron con solución tampón y se filtraron o centrifugaron previamente a su extracción para evitar que las columnas se atasquen. Este proceso de extracción de melatonina se realizó con todas las muestras incluyendo estándares y controles.

3.1.7.2.1. Preparación/acondicionamiento de las columnas

Las columnas de extracción fueron preparadas en tubos de poliestireno añadiéndose 2 ml de metanol sin diluir y centrifugándose (centrifugadora HETO VR-1) durante un minuto a 200 g. Posteriormente se agregaron 2 ml de agua bidestilada a las mismas y se volvieron a centrifugar de igual forma. Se procedió sin demora a la aplicación de una muestra por cada columna para evitar su desecación.

3.1.7.2.2. Aplicación de las muestras

Cada columna se colocó dentro de tubos adecuadamente rotulados, añadiéndose 0,5 ml de los estándares, controles y muestras, y centrifugándose a 200 g durante 1 min.

3.1.7.2.3. Lavado

Tras la adición de 2 ml de metanol al 10% en agua bidestilada (volumen/volumen) se volvieron a centrifugar durante 1 min a 500 g.

3.1.7.2.4. Dilución del extracto

Las columnas se situaron dentro de tubos de poliestireno convenientemente rotulados y tras colocar en éstas 1ml de metanol sin diluir, se centrifugaron durante 1 min a 200g, retirándose posteriormente de los tubos evitando vertidos.

Se reutilizaron las columnas para la extracción de las muestras sucesivas un máximo de 3 a 4 veces.

3.1.7.2.5. Evaporación y reconstitución de los extractos

Para la evaporación hasta desecación del metanol se empleó una centrifugadora evaporadora (centrifugadora evaporadora con trampa de frío HETO CT-110). Las muestras se procesaron inmediatamente tras su reconstitución con 0,15 ml de agua bidestilada y agitación rotatoria durante al menos 1 min.

3.1.7.3. Preparación de los reactivos

3.1.7.3.1. Estándares y sueros control

Los contenidos de cada vial se diluyeron en agitación durante 15 min con 2 ml de agua bidestilada.

3.1.7.3.2. Tampón del ensayo

Su contenido es tampón fosfato con tween y estabilizante, y se diluyó el concentrado en proporción volumen/volumen 1:10 en agua bidestilada.

3.1.7.3.3. Melatonina-biotina

Reconstituida añadiendo 2 ml de tampón a cada vial de melatonina biotina liofilizada y agitando durante 15 min.

3.1.7.3.4. Enzima conjugada

Se trata de un concentrado de anti-biotina-fosfatasa alcalina en tampón TRIS con estabilizantes, cuya reconstitución se realizó diluyendo 70 µl de concentrado de enzima conjugado en 5,6 ml de tampón.

3.1.7.3.5. Antisuero

Es un antisuero de conejo liofilizado y estabilizado. Se disolvió el contenido de cada vial en 2 ml de agua bidestilada mezclando durante 15 min.

3.1.7.3.6. Solución de sustrato p-nitrofenil fosfato (PNPP)

Se diluyeron 3 tabletas de sustrato PNPP en 8 ml de tampón para sustrato (dietanolamina) 10 min antes de su empleo.

3.1.7.4. Procedimiento del ensayo

Las muestras, estándares y controles se procesaron por duplicado pipeteando 50 µl de cada una de ellos en los pocillos de la placa microtiter conjugada con anticuerpos de cabra anti-conejo. Posteriormente se vertieron 50 µl de melatonina biotina y más tarde igual cantidad de antisuero, agitando la placa cuidadosamente. La placa se selló con una lámina sellante (Parafilm®) y se incubó a 4° C durante las 14:00h-20:00h.

Tras el período de incubación, se lavaron las placas tres veces con solución tampón mediante un sistema de lavado harvester (INOTECH IH-110). Se retiró el tampón cuidadosamente retirando cualquier resto líquido invirtiendo las placas sobre papel secante. Una vez concluido el proceso de lavado se introdujeron en cada pocillo 150 µl de enzima conjugado, y tras sellado de las placas con parafilm, se incubaron a temperatura ambiente durante 120 min en un agitador orbital a 500U/min (Janke & Kunkel. IKA-Labortechnik MS-4). Se realizó un nuevo proceso de lavado de las placas idéntico al descrito previamente y después, se añadió a cada pocillo 200 µl de solución

sustrato PNPP, incubando las placas durante 30 min de igual forma al paso anterior. Se paró la reacción colocando 50 µl de solución de parado PNPP (hidróxido sódico 1N con 0,25 M de EDTA) a cada pocillo, agitando las placas, breve y suavemente, para mezclar el contenido. La lectura se realizó a una densidad óptica (OD) de 405 nm con un lector de placas microtiter antes de transcurrir 60 min tras parar la reacción.

3.1.7.5. Cálculo de resultados

Una vez comprobado que las muestras dadas como controles por el equipo para ELISA coincidían con los valores teóricos dados, se procedió a la elaboración de una curva con los valores obtenidos de los especímenes considerados como estándar por el preparado comercial, y a la obtención de los resultados de las muestras problema, para su posterior procesamiento estadístico.

Las concentraciones de los estándares (abcisas, logarítmico) fueron comparadas con sus correspondientes densidades ópticas (ordenadas, lineal) en un papel con escala semilogarítmica.

La concentración de las muestras fue leída directamente desde la curva estándar utilizando el promedio de densidad óptica. Si la lectura de alguna muestra fue superior al mayor de los estándar, ésta se diluyó con tampón previamente a la fase de extracción y se volvió a realizar la detección.

Un ejemplo típico de la curva estándar con ELISA para melatonina se representa en la tabla I, y en la figura 8 que pueden verse a continuación.

TABLA I. CURVA ESTÁNDAR ELISA PARA MELATONINA

Concentración (pg/ml)	OD 1	OD 2	Valor Medio OD	OD/ODmax (%)	CV (%)
0,0	1,489	1,545	1,517	100	2,6
3,0	1,389	1,376	1,383	91,1	0,7
10	1,222	1,207	1,214	80,1	0,9
30	0,872	0,861	0,867	57,1	0,9
100	0,442	0,426	0,434	28,6	2,6
300	0,263	0,257	0,260	17,1	1,6

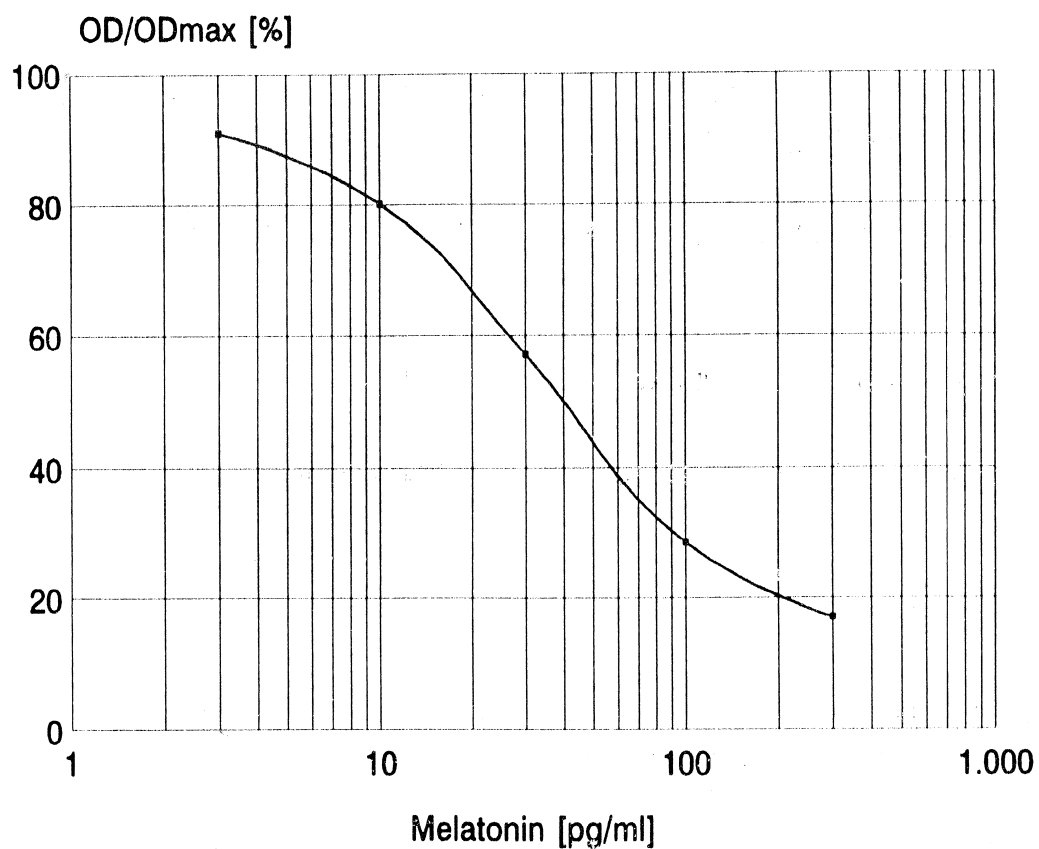


FIG. 8. CURVA ESTÁNDAR ELISA PARA MELATONINA

3.1.7.6. Especificaciones técnicas del ensayo

3.1.7.6.1. Valores esperados

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de valores de melatonina. Los niveles de la hormona en humanos sufren un marcado ritmo circadiano caracterizado por muy bajos niveles durante el día y altos niveles durante el período nocturno, marcando fuertes variaciones interindividuales y con la edad. La figura inferior muestra el ritmo circadiano de seis voluntarios sanos.

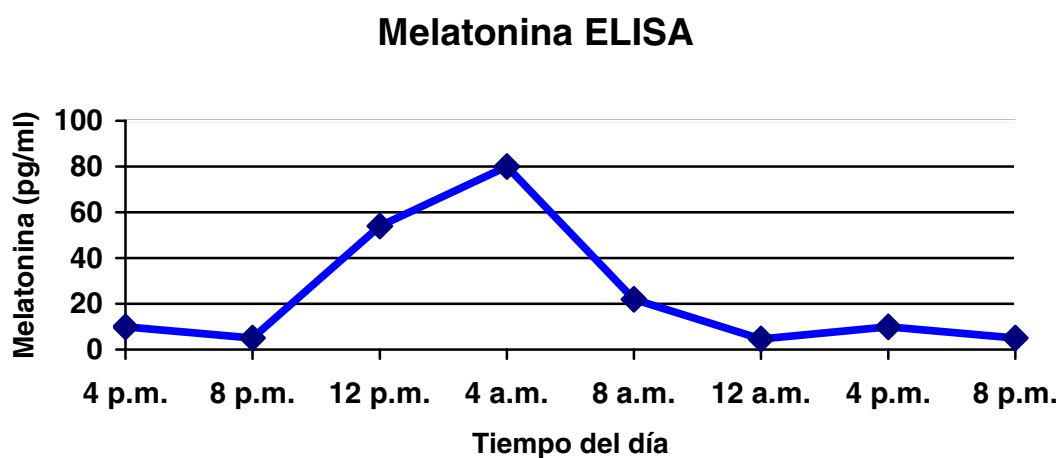


FIG. 9. RITMO CIRCADIANO DE MELATONINA

Los valores medios alcanzan un mínimo sobre los 4,6 a 10 pg/ml sobre las 4 p.m. durante el día y un máximo de 77,5 a 90 pg/ml durante la noche a las 4 a.m., aunque existe una gran variabilidad interindividual.

3.1.7.6.2. Especificidad

En las muestras es posible encontrar varios componentes con reactividad cruzada respecto al antisuero y que pueden verse en la tabla II.

TABLA II. ESPECIFICIDAD

Componente	Reactividad cruzada (%)
Melatonina	100
5-Metoxitriptófano	0,5
N-Acetilserotonina	0,4
5-Metoxitriptamina	0,1
5-Hidroxi-L-Triptófano	0,01
6-Metoxitriptamina	<0,01
3-ácido acético-5-Metoxiindol	<0,01
Serotonina	<0,01
DL-Triptófano	<0,01
DL-5-Metoxitriptófano	<0,01

3.1.7.6.3. Sensibilidad

El nivel detectable más bajo de melatonina es de 3,0 pg/ml.

3.1.7.6.4. Precisión

Las variaciones del enzimoimmunoanálisis intraensayo, entre ensayos, y entre la fase de extracción e inmunoensayo entre ensayos, pueden apreciarse en las tablas III, IV, y V.

PRECISIÓN

TABLA III. Variaciones de ELISA intraensayo (pg/ml)

Media	Desviación estándar	CV (%)	n
6,8	0,59	8,8	12
19,2	2,0	10,5	12
48,9	1,6	3,3	12

TABLA IV. Variaciones de ELISA entre ensayos (pg/ml)

Media	Desviación estándar	CV (%)	n
9,2	1,5	15,7	12
74	5,0	6,9	12

TABLA V. Variaciones de ELISA entre la fase de extracción e inmunoensayo entre ensayos (pg/ml)

Media	Desviación estándar	CV (%)	n
5,2	0,99	19,0	10
34	3,0	9,0	10

3.1.7.6.5. Linealidad

La tabla VI refleja los valores de la concentración de melatonina en pg/ml en muestras problema de pacientes tras diferentes diluciones con tampón de ensayo.

TABLA VI. LINEALIDAD

Dilución	Sin diluir	1/2	1/4	1/8	1/16
Muestra	300	312	324	318	328
1	(100%)	(104%)	(108%)	(106%)	(109%)
Muestra	233	225	233	290	224
2	(100%)	(97%)	(100%)	(124%)	(96%)
Muestra	114	129	133	115	99
3	(100%)	(113%)	(116%)	(101%)	(87%)
Muestra	173	174	202	163	139
4	(100%)	(100%)	(117%)	(94%)	(81%)

3.1.7.6.6. Recuperación (pg/ml)

Si las muestras de los pacientes son enriquecidas con cantidades crecientes de melatonina se puede observar el índice de recuperación (tabla VII).



TABLA VII. RECUPERACIÓN

	Concentración Actual	Cantidad añadida	Cantidad recuperada	Cantidad esperada	Recuperación (%)
Muestra 1	7,7	5	13,3	12,7	105
	7,7	10	17,2	17,7	97
	7,7	20	26,2	27,7	95
	7,7	40	51,3	47,7	108
	7,7	80	85,4	87,7	97
	7,7	160	158,4	167,7	94
Muestra 2	7,5	5	12,9	12,5	103
	7,5	10	18,5	17,5	106
	7,5	20	28,0	27,5	102
	7,5	40	47,8	47,5	101
	7,5	80	78,6	87,5	100
	7,5	160	138,0	167,5	82
Muestra 3	6,6	5	11,1	11,6	96
	6,6	10	16,5	16,6	99
	6,6	20	25,4	26,6	95
	6,6	40	49,8	46,6	107
	6,6	80	82,0	86,6	95
	6,6	160	161,6	166,6	97
Muestra 4	8,3	5	12,1	12,3	98
	8,3	10	17,1	18,3	93
	8,3	20	27,8	28,3	98
	8,3	40	48,6	48,3	101
	8,3	80	88,0	88,3	100
	8,3	160	163,2	168,3	97



La figura 10 recoge la comparación mediante regresión lineal del método ELISA respecto a RIA disponible comercialmente.

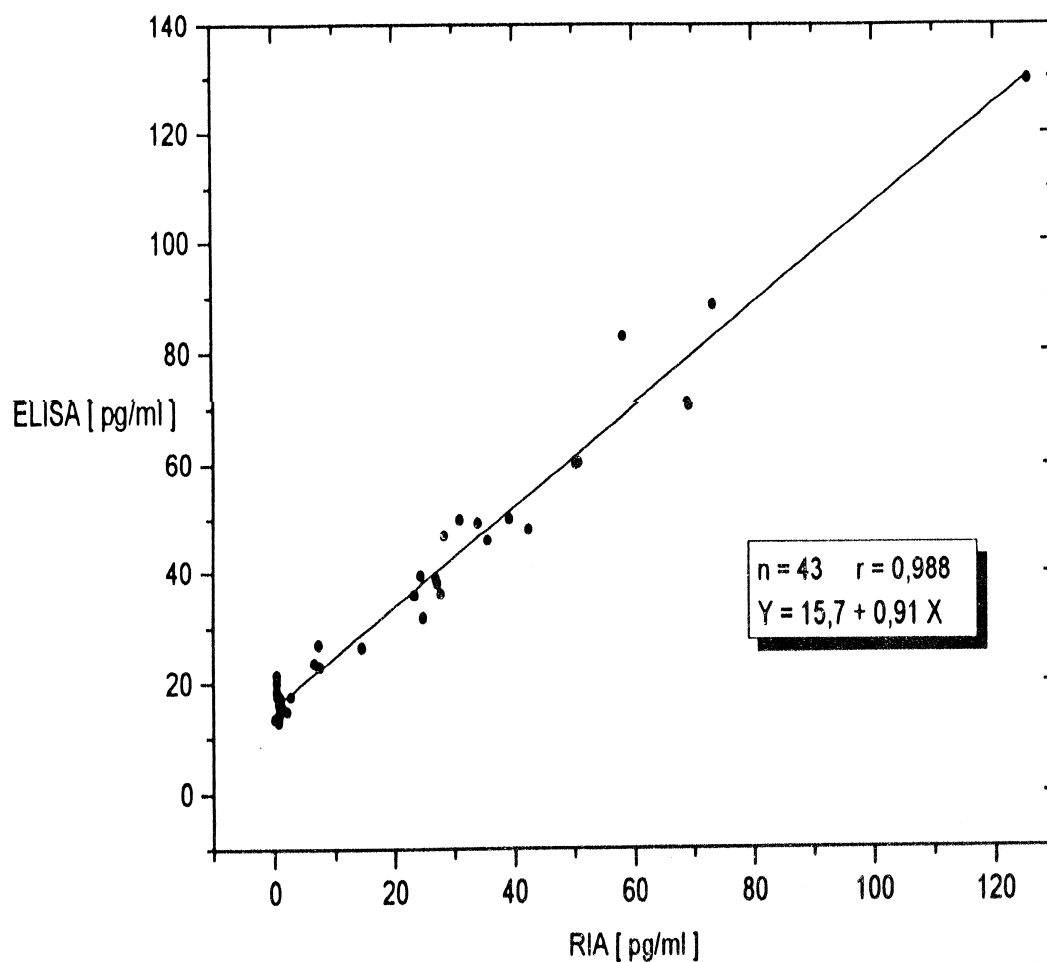


FIG. 10. COMPARACIÓN DEL MÉTODO ELISA RESPECTO A RIA

3.2. MÉTODO ESTADÍSTICO

3.2.1. Diseño

Estudio de los niveles plasmáticos de melatonina en humanos, observacional, prospectivo y con migración aleatoria, mediante asignación aleatoria estratificada en bloques por sexos con el programa M.A.S. (Muestreo y Asignaciones Aleatorias 2.1) del grupo de programas C4–SDP (Study Design Pack, Glaxo-Wellcome, Madrid, España).

3.2.2. Sujetos de estudio

Pacientes de 18-50 años y de ambos sexos, ASA-I, que van a ser sometidos a cirugía traumatológica programada de miembros inferiores entre las 12:00 h y las 17:00 h. Realización de anestesia intrarraquídea con o sin sedación. La sedación a nivel de hipnosis será con un solo fármaco (midazolam o propofol).

3.2.3. Variable Dependiente

Concentración plasmática de melatonina en los distintos tiempos.

3.2.4. Variables Independientes

Edad, sexo, droga administrada para sedación.

3.2.5. Variables de confusión

Duración de la intervención y tipo de cirugía en cuanto a su localización en miembros inferiores.

3.2.6. Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño muestral se realizó mediante comparación de dos medias de una muestra, empleando el programa C.T.M. del grupo de programas C4–SDP (Study Design Pack).

$n=4$ pacientes en cada grupo, prueba bilateral con estimación de pérdidas del 10%, para $\alpha=0,025$, $\beta=0,025$, $1-\beta=97,5\%$, aunque se realizó el estudio con 10 pacientes ante la posibilidad de pérdida de participantes en las distintas fases del estudio: inclusión, aleatorización, seguimiento y análisis.

Los grupos de estudio fueron los siguientes:

- Realización de anestesia intrarraquídea con midazolam en perfusión continua.
- Realización de anestesia intrarraquídea con propofol en perfusión continua.
 - Para observar posibles ascensos en los niveles de melatonina plasmática, desde rangos basales (aproximadamente 10 pgr/ml), hasta hipnóticos (mayores o iguales a 40 pgr/ml) tras la administración de las drogas midazolam o propofol.
- Realización de anestesia intrarraquídea sin sedación.

- Intentando apreciar la posible influencia de la anestesia y/o cirugía sobre los niveles del indol.
- Toma de muestra única basal en sujetos voluntarios sanos que reúnen los criterios de inclusión y exclusión.
 - Como grupo control intraensayo sobre los valores basales, en sujetos no sometidos al estrés anestésico ni quirúrgico.

3.2.7. Base de datos

Elaboración en Excell 9.0 para windows XP.

3.2.8. Análisis estadístico

Todo el estudio, tanto descriptivo como analítico, fue realizado mediante el programa para cálculo estadístico SPSS 10.1 (Statistical Package for the Social Science for Windows).

Para observar posibles diferencias en la edad y tiempo de cirugía entre los grupos se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor.

Para el análisis entre sexos y para comparar en su conjunto los valores de la concentración de melatonina plasmática en los distintos tiempos:

- Basales.
- 10 minutos tras iniciada la sedación.
- 60 minutos tras iniciada la sedación.

- 90 minutos tras retirar la sedación.

y en los diferentes grupos:

- Realización de anestesia intrarraquídea con midazolam en perfusión continua.
- Realización de anestesia intrarraquídea con propofol en perfusión continua.
- Realización de anestesia intrarraquídea sin sedación.
- Curva estándar, realizada con los valores, tanto basales como a nivel hipnótico, recogidos en la literatura.

se empleó el test ANOVA de medidas repetidas $n=40$, 10 pacientes en cada grupo.

También se realizó la comparación de los valores basales de los grupos con otro, no sometido a cirugía ni sedación, mediante ANOVA univariante, $n= 50$, 10 pacientes en cada grupo. El estudio del resto de los valores de la variable dependiente, es decir, de las varianzas de las concentraciones plasmáticas de melatonina en los minutos 10 y 60 tras iniciada la sedación y en el minuto 90 tras retirada la misma, respecto a los diferentes grupos de estudio (propofol, midazolam, sin sedación y curva estándar), se efectuó con ANOVA univariante, $n=40$, 10 pacientes en cada grupo.

RESULTADOS

4.RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

4.1.1. Datos demográficos

4.1.1.1.Edad

La edad de todos los casos, $n=40$, estuvo comprendida entre los 18 a 50 años, con una media de 31,1 años y una desviación estándar de 7,88. En la tabla VIII se refleja la distribución por edades, así como otras características de los pacientes. No se apreciaron diferencias de edad significativas entre los distintos grupos de estudio, como puede apreciarse en la tabla IX.

TABLA VIII. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Paciente	Edad	Sexo	Tipo de cirugía	Grupo	Duración de intervención
1	36	M	Artroscopia de rodilla	Propofol	1 h 25 min
2	50	F	Artroscopia de rodilla	Propofol	1 h 30 min
3	36	F	Fractura de tobillo	Propofol	1 h 20 min
4	29	M	Artroscopia de rodilla	Propofol	1 h 00 min
5	21	F	Repar. ligamento rodilla	Propofol	1 h 35 min
6	22	F	Fractura de tobillo	Propofol	1 h 50 min
7	19	M	Repar. ligamento rodilla	Propofol	1 h 30 min
8	41	M	Repar. ligamento rodilla	Propofol	1 h 20 min
9	34	M	Hallux valgus	Propofol	1 h 35 min
10	36	F	Hallux valgus	Propofol	1 h 10 min
11	33	M	Repar. ligamento rodilla	Midazolam	1 h 55 min
12	47	M	Pie cavo	Midazolam	2 h.00.min
13	47	F	Fibrosis plantar	Midazolam	1 h 00 min
14	22	F	Hallux valgus	Midazolam	1 h 00 min
15	23	M	Partes blandas	Midazolam	1 h 00 min
16	25	M	Repar. ligamento rodilla	Midazolam	1 h 40 min
17	22	F	Hallux valgus	Midazolam	1 h 00 min
18	18	F	Repar. ligamento rodilla	Midazolam	1 h 30 min
19	32	F	Repar. ligamento rodilla	Midazolam	1 h 45 min
20	28	M	Fractura de tobillo	Midazolam	1 h 50 min
21	22	F	Artroscopia de rodilla	Sin sedación	1 h 10 min
22	24	M	Artroscopia de rodilla	Sin sedación	1 h 35 min
23	26	M	Artroscopia de rodilla	Sin sedación	1 h 00 min
24	33	F	Hallux valgus	Sin sedación	1 h 25 min
25	23	F	Hallux valgus	Sin sedación	1 h 15 min
26	24	F	Repar. ligamento rodilla	Sin sedación	1 h 20 min
27	23	M	Artroscopia de rodilla	Sin sedación	1 h 00 min
28	28	M	Fractura de tobillo	Sin sedación	1 h 55 min
29	38	F	Hallux valgus	Sin sedación	0 h 55 min
30	34	M	Repar. ligamento rodilla	Sin sedación	1 h 40 min
31	32	F	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía
32	34	F	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía
33	33	F	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía
34	32	F	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía
35	35	M	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía
36	36	M	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía
37	36	M	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía
38	34	F	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía
39	37	M	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía
40	39	M	Control basal	Sin sedación	Sin cirugía

TABLA IX. SIGNIFICACIÓN PARA DIFERENCIAS DE EDAD ENTRE GRUPOS

PRUEBA DE ANOVA

		Suma de cuadrados	g.l.	Media cuadrática	F	Sig.
Propofol	Inter-grupos	4,800	20	0,240	1,689	0,129
	Intra-grupos	2,700	19	0,142		
	Total	7,500	39			
Midazolam	Inter-grupos	4,000	20	0,200	1,086	0,430
	Intra-grupos	3,500	19	0,184		
	Total	7,500	39			
Sin sedación	Inter-grupos	4,167	20	0,208	1,188	0,356
	Intra-grupos	3,333	19	0,175		
	Total	7,500	39			
Sin cirugía	Inter-grupos	3,967	20	0,198	1,607	0,446
	Intra-grupos	3,533	19	0,186		
	Total	7,500	39			

4.1.1.2. Género

Todos los grupos del estudio se dividieron al 50% entre sexo masculino y femenino, 5 varones y 5 mujeres en cada grupo, $n=40$, 20 mujeres y 20 varones. Las medias de las concentraciones plasmáticas de melatonina por género, de forma general y según tipo de fármaco empleado, se encuentran representadas a continuación en las tablas X y XI y en las figuras 11 a 14.

TABLA X. MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS GLOBALES A TODOS LOS GRUPOS SEGÚN SEXO

		Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
SEXO	MELATONINA			Límite inferior	Límite superior
Varón	Basal	5,733	2,623	0,361	11,106
	Minuto 10	21,200	5,081	10,792	31,608
	Minuto 60	12,133	4,274	3,379	20,887
	Minuto 90	20,067	7,027	5,673	34,461
Mujer	Basal	10,200	2,623	4,827	15,573
	Minuto 10	21,867	5,081	11,459	32,274
	Minuto 60	16,933	4,274	8,179	25,687
	Minuto 90	25,600	7,027	11,206	39,994

TABLA XI. MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS SEGÚN SEXO Y TIPO DE DROGA

			Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
SEXO	DROGA	MELATONINA			Límite inferior	Límite superior
Varón	Propofol	Basal	7,400	4,666	-2,231	17,031
		Minuto 10	30,000	6,828	15,908	44,092
		Minuto 60	12,400	7,421	-2,917	27,717
		Minuto 90	37,200	11,603	13,253	61,147
	Midazolam	Basal	5,800	4,666	-3,831	15,431
		Minuto 10	28,400	6,828	14,308	42,492
		Minuto 60	17,200	7,421	1,883	32,517
		Minuto 90	15,000	11,603	-8,947	38,947
	Sin sedación	Basal	4,000	4,666	-5,631	13,631
		Minuto 10	5,200	6,828	-8,892	19,292
		Minuto 60	6,800	7,421	-8,517	22,117
		Minuto 90	8,000	11,603	-15,947	31,947
Mujer	Propofol	Basal	4,800	4,666	-4,831	14,431
		Minuto 10	42,200	6,828	28,108	56,292
		Minuto 60	27,200	7,421	11,883	42,517
		Minuto 90	36,200	11,603	12,253	60,147
	Midazolam	Basal	14,600	4,666	4,969	24,231
		Minuto 10	16,400	6,828	2,308	30,492
		Minuto 60	11,800	7,421	-3,517	27,117
		Minuto 90	32,200	11,603	8,253	56,147
	Sin sedación	Basal	11,200	4,666	1,569	20,831
		Minuto 10	7,000	6,828	-7,092	21,092
		Minuto 60	11,800	7,421	-3,517	27,117
		Minuto 90	8,400	11,603	-15,547	32,347

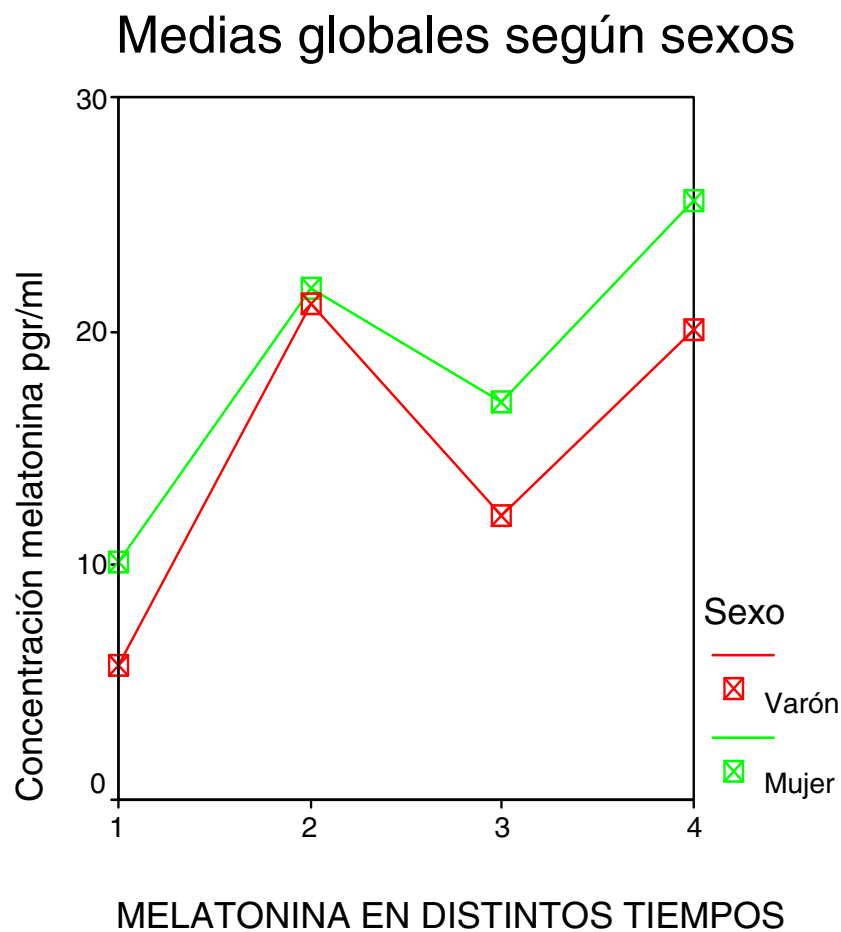
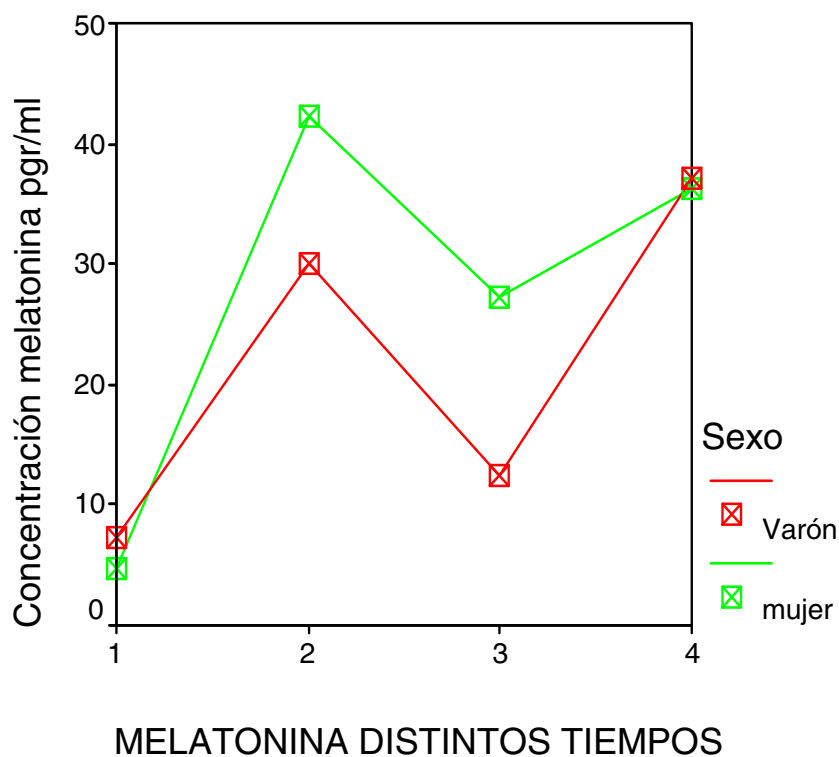


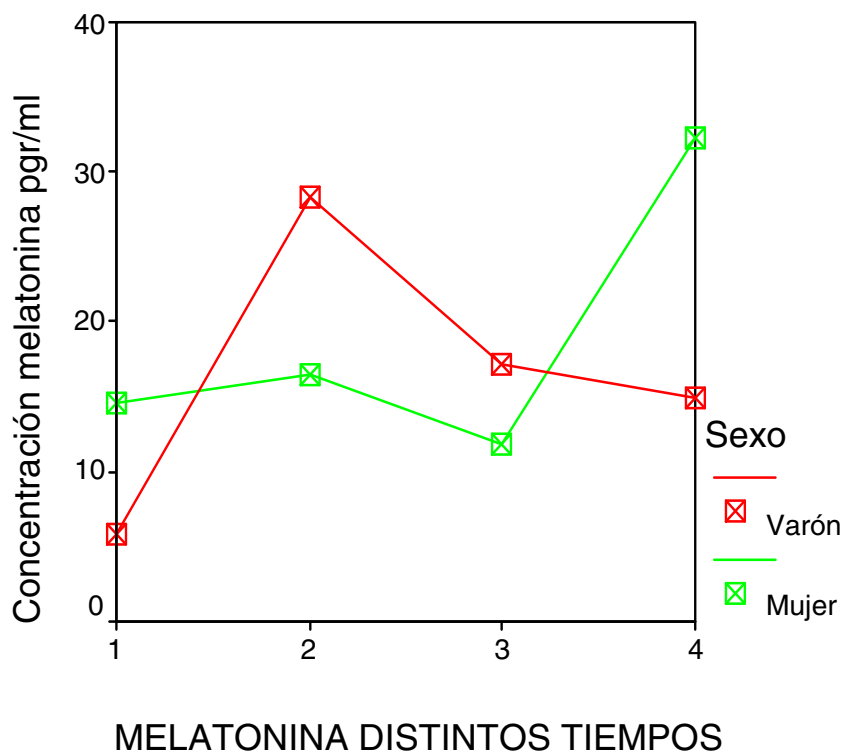
FIG. 11. MEDIAS GLOBALES EN LOS DISTINTOS TIEMPOS SEGÚN GÉNERO

Medias marginales según sexo empleando propofol



**FIG. 12. MEDIAS EN LOS DISTINTOS TIEMPOS SEGÚN
GÉNERO EMPLEANDO PROPOFOL**

Medias marginales según sexos empleando midazolam



**FIG. 13. MEDIAS EN LOS DISTINTOS TIEMPOS SEGÚN
GÉNERO EMPLEANDO MIDAZOLAM**

Medias marginales según sexos sin emplear sedación

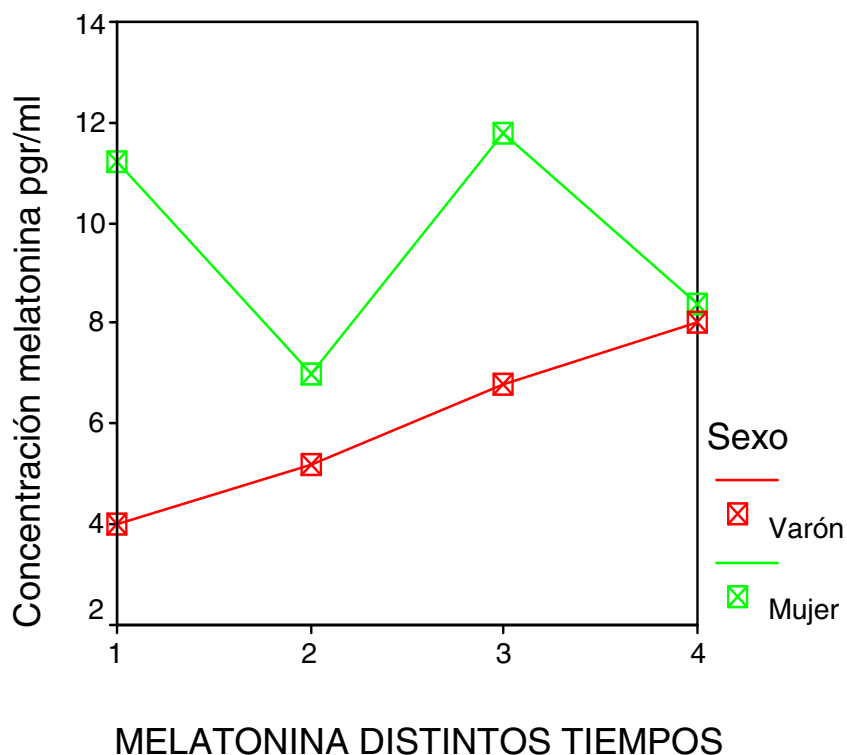


FIG. 14. MEDIAS EN LOS DISTINTOS TIEMPOS SEGÚN GÉNERO SIN EMPLEAR SEDACIÓN

(1=muestra basal, 2=minuto 10 tras sedación, 3 =minuto 60 tras sedación, y 4=minuto 90 tras ser retirada la misma).

No se apreciaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de melatonina entre sexos en los distintos tiempos, ni de forma global ($p=0,361$), ni separados en los diferentes grupos de estudio ($p=0,909$), como puede observarse en las tablas XII y XIII.

TABLA XII. ANOVA PARA MEDIDAS REPETIDAS GLOBALES A TODOS LOS GRUPOS SEGÚN SEXO

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida: Concentraciones plasmáticas de melatonina en los distintos tiempos

Variable transformada: Promedio

FUENTE	Suma de cuadrados tipo III	Grados libertad	Media cuadrática	F	Significación
Intercept	33533,633	1	33533,633	64,555	0,000
SEXO	448,533	1	448,533	0,863	0,361
Error	14544,833	28	519,458		

TABLA XIII. ANOVA PARA MEDIDAS REPETIDAS SEGÚN SEXO Y TIPO DE DROGA

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida: Concentraciones plasmáticas de melatonina en los distintos tiempos

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Grados libertad	Media cuadrática	F	Significación
Intercept	33533,633	1	33533,633	92,243	0,000
SEXO	448,533	1	448,533	1,234	0,278
DROGA	5750,417	2	2875,208	7,909	0,002
SEXO * DROGA	69,517	2	34,758	0,096	0,909
Error	8724,900	24	363,537		

4.1.2. Datos clínicos

4.1.2.1. Grado funcional

Todos los sujetos incluidos en el estudio pertenecían al grupo I de la clasificación de la ASA.

La evaluación preoperatoria del riesgo quirúrgico global difundida por la Sociedad Americana de Anestesiología: clasificación ASA, establece una división de los pacientes en seis grupos, siendo los del grupo I sujetos sanos, y sigue una gradación de riesgo ascendente hasta el grupo VI, que serían aquellos que estando en muerte cerebral son susceptibles de donación de órganos.

4.1.2.2. Parámetros de monitorización

No se recogió ningún caso de depresión respiratoria debida a la sedación y los datos que nos reveló la pulxioximetría, en todos los sujetos y en todo momento, estaban comprendidos entre el 96 y el 100% de saturación periférica de oxígeno.

El registro electrocardiográfico continuo fue normal y no sufrió alteraciones.

La presión arterial sanguínea incruenta fue registrada a intervalos de cinco minutos, no observándose alteraciones en ella, tras la hidratación con un litro de cristaloides previa a la realización de anestesia intrarraquídea.

4.1.2.3. Duración de la cirugía

En cuanto a la duración media de la cirugía fue de 84 min con una desviación típica de 19min. La tabla XIV recoge los tiempos de cirugía registrados, mientras que la tabla XV muestra la prueba de ANOVA, en la que se aprecia que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio.

TABLA XIV. TABLA DE CONTINGENCIA RESPECTO AL TIEMPO DE CIRUGÍA Y TIPO DE DROGA

Recuento

		DROGA			Total
		Propofol	Midazolam	Sin sedación	
TIEMPO	0:55:00			1	1
	1:00:00	1	4	2	7
	1:10:00	1		1	2
	1:15:00			1	1
	1:20:00	2		1	3
	1:25:00	1		1	2
	1:30:00	2	1		3
	1:35:00	2		1	3
	1:40:00		1	1	2
	1:45:00		1		1
	1:50:00	1	1		2
	1:55:00		1	1	2
	2:00:00		1		1
Total		10	10	10	30

TABLA XV. PRUEBA DE ANOVA PARA LOS TIEMPOS DE CIRUGÍA

		Suma de cuadrados	g.l.	Media cuadrática	F	Sig.
Propofol	Inter-grupos	2,310	12	0,192	0,751	0,689
	Intra-grupos	4,357	17	0,256		
	Total	6,667	29			
Midazolam	Inter-grupos	2,786	12	0,232	1,017	0,475
	Intra-grupos	3,881	17	0,228		
	Total	6,667	29			
Sin sedación	Inter-grupos	1,905	12	0,159	0,567	0,840
	Intra-grupos	4,762	17	0,280		
	Total	6,667	29			

4.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EN BASE AL ESTUDIO ESTADÍSTICO

4.2.1. ANOVA de medidas repetidas de las concentraciones de melatonina en los diferentes tiempos

En la tabla XVI se describen las medias de las concentraciones plasmáticas de melatonina en función de las diferentes determinaciones realizadas en cada grupo de estudio (1=muestra basal, 2=minuto 10 tras sedación, 3=minuto 60 tras sedación, y 4=minuto 90 tras ser retirada la misma). La siguiente tabla (tabla XVII), muestra el test de Games-Howell para comparaciones múltiples en el que se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas en el conjunto de valores de la variable dependiente entre el grupo sometido a sedación con propofol o midazolam, y la curva estándar ($p > 0,2$ en el peor de los casos). En cambio, sí se aprecian claras diferencias entre los grupos propofol y curva estándar, y el que no fue sometido a sedación pero sí a cirugía ($p < 0,003$ y $p < 0,000$, respectivamente). En el caso de los sujetos sometidos a sedación con midazolam, al compararlos con los no sometidos a sedación, no se calculan diferencias ($p = 0,093$).

**TABLA XVI. MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS EN LOS DISTINTOS TIEMPOS
EN CADA GRUPO**

		Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
DROGA	MELATONINA			Límite inferior	Límite superior
Propofol	Basal	6,100	2,864	0,292	11,908
	Minuto 10	36,100	4,195	27,593	44,607
	Minuto 60	19,800	4,501	10,672	28,928
	Minuto 90	36,700	6,851	22,805	50,595
Midazolam	Basal	10,200	2,864	4,392	16,008
	Minuto 10	22,400	4,195	13,893	30,907
	Minuto 60	14,500	4,501	5,372	23,628
	Minuto 90	23,600	6,851	9,705	37,495
Sin sedación	Basal	7,600	2,864	1,792	13,408
	Minuto 10	6,100	4,195	-2,407	14,607
	Minuto 60	9,300	4,501	0,172	18,428
	Minuto 90	8,200	6,851	-5,695	22,095
Curva estándar	Basal	10,000	2,864	4,192	15,808
	Minuto 10	40,000	4,195	31,493	48,507
	Minuto 60	40,000	4,501	30,872	49,128
	Minuto 90	10,000	6,851	-3,895	23,895

TABLA XVII. COMPARACIONES MÚLTIPLES DE GAMES-HOWELL PARA LOS DISTINTOS TIEMPOS EN CADA GRUPO

		Diferencia medias I-J	Error típico	Significación	Intervalo de confianza 95%	
(I) DROGA	(J) DROGA				Límite inferior	Límite superior
Propofol	Midazolam	7,0000	3,58294	0,472	-6,4114	20,4114
	Sin sedación	16,8750	3,58294	0,003	5,9595	27,7905
	Curva estándar	-0,3250	3,58294	1,000	-10,6291	9,9791
Midazolam	Propofol	-7,0000	3,58294	0,472	-20,4114	6,4114
	Sin sedación	9,8750	3,58294	0,093	-1,3453	21,0953
	Curva estándar	-7,3250	3,58294	0,209	-17,9658	3,3158
Sin sedación	Propofol	-16,8750	3,58294	0,003	-27,7905	-5,9595
	Midazolam	-9,8750	3,58294	0,093	-21,0953	1,3453
	Curva estándar	-17,2000	3,58294	0,000	-22,7514	-11,6486
Curva estándar	Propofol	0,3250	3,58294	1,000	-9,9791	10,6291
	Midazolam	7,3250	3,58294	0,209	-3,3158	17,9658
	Sin sedación	17,2000	3,58294	0,000	11,6486	22,7514

La aplicación del test de Games-Howell en lugar de la corrección de Bonferroni se explica porque al realizar la prueba de contraste de Levene sobre la igualdad de varianzas, éstas no resultan iguales ($p \leq 0,003$).

Las medias de cada uno de los valores de la variable dependiente en cada grupo de estudio (propofol, midazolam, sin sedación), respecto a la curva estándar se ven reflejadas en la figura 15. La figura 16 representa los valores plasmáticos de melatonina en cada paciente en todos los grupos.

Medias marginales estimadas en los diferentes grupos

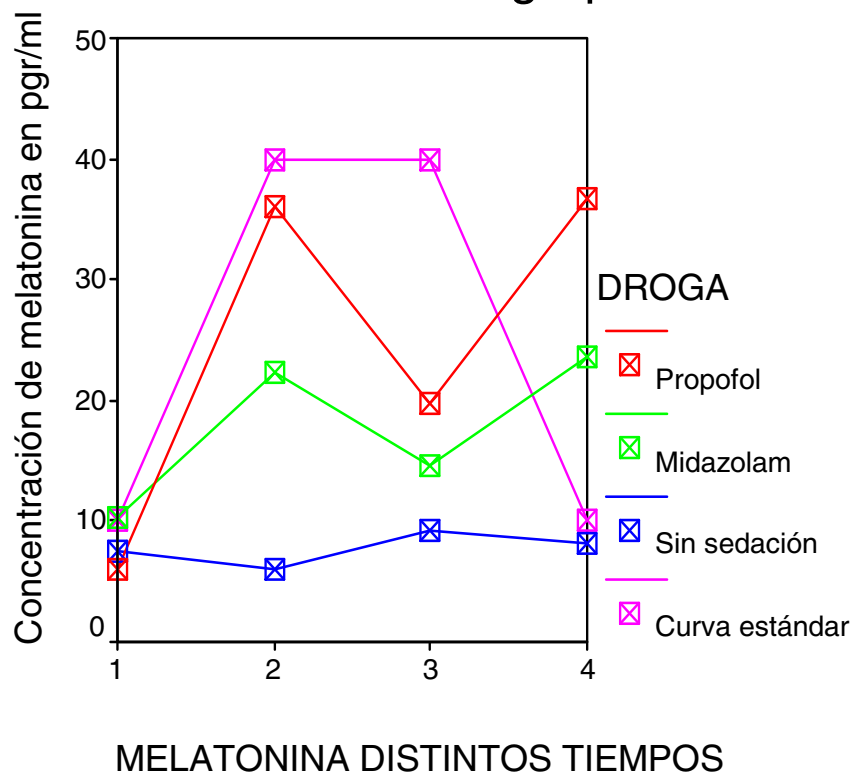
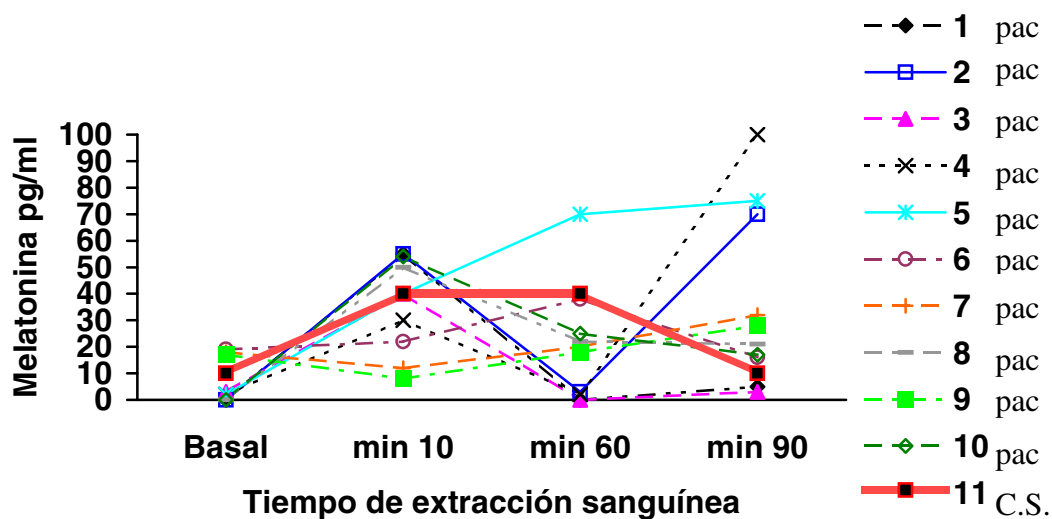


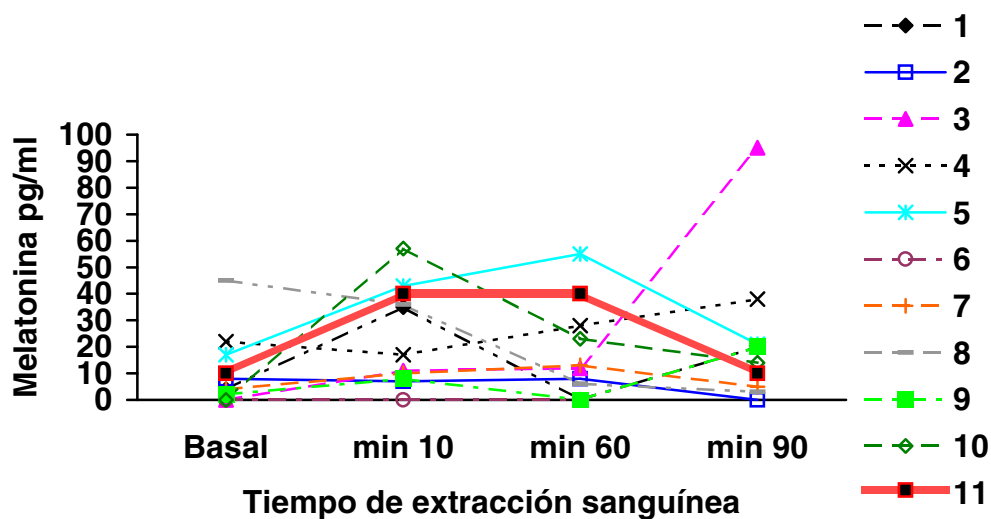
FIG. 15. MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE MELATONINA EN LOS DISTINTOS TIEMPOS SEGÚN GRUPO DE ESTUDIO



MELATONINA PLASMÁTICA EN GRUPO SOMETIDO A SEDACIÓN CON
PROPOFOL



MELATONINA PLASMÁTICA EN GRUPO SOMETIDO A SEDACIÓN CON
MIDAZOLAM



MELATONINA PLASMÁTICA EN GRUPO NO SOMETIDO A SEDACIÓN

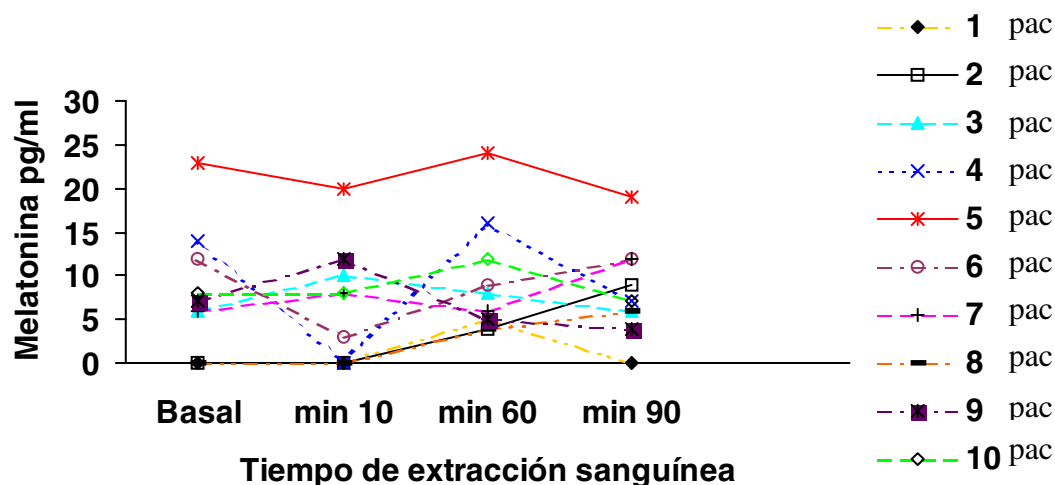


Fig. 16. Concentraciones plasmáticas de melatonina para cada paciente en los diferentes tiempos en cada grupo de estudio. Los pacientes fueron aleatoriamente asignados en diferentes grupos: anestesia espinal y sedación con propofol o midazolam, o no sometidos a sedación (diez pacientes en cada grupo). Para facilitar la lectura los valores se muestran en diferentes gráficos. La curva estándar (C.S.) indica una hipotética curva que registra los valores medios de melatonina tanto a nivel basal como hipnótico recogidos en la literatura.

4.2.2. ANOVA univariante de las concentraciones de melatonina basales

Las medias de las concentraciones plasmáticas de melatonina basales en cada grupo de estudio pueden verse en la tabla XVIII. La tabla XIX muestra el test de Games-Howell en el que se aprecia que no existen diferencias significativas en los valores basales entre los diferentes grupos:

- Sometido a sedación con propofol.
- Sometido a sedación con midazolam.
- No sometidos a sedación.
- Grupo control para muestra basal o no sometidos a sedación ni cirugía.
- Curva estándar.

siendo $p > 0,269$ en el peor de los casos.

La aplicación del test de Games-Howell en lugar de la corrección de Bonferroni sigue idénticos criterios que en el apartado anterior ($p = 0,001$).

La figura 17 expresa las medias ± 1 desviación típica de cada uno de los valores basales de la variable dependiente en cada grupo de estudio.

TABLA XVIII. MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS PARA LOS VALORES DE MELATONINA PLASMÁTICA BASAL EN CADA GRUPO

	Media	Error típico	Intervalo de confianza al 95%.	
DROGA			Límite inferior	Límite superior
Propofol	6,100	2,696	0,669	11,531
Midazolam	10,200	2,696	4,769	15,631
Sin sedación	7,600	2,696	2,169	13,031
Sin cirugía	5,900	2,696	0,469	11,331
Curva estándar	10,000	2,696	4,569	15,431

TABLA XIX. COMPARACIONES MÚLTIPLES DE GAMES-HOWELL PARA LOS VALORES DE MELATONINA PLASMÁTICA BASAL EN CADA GRUPO

		Diferencia medias I-J	Error típico	Significación	Intervalo de confianza 95%	
(I) DROGA	(J) DROGA				Límite inferior	Límite superior
Propofol	Midazolam	-4,1000	3,81331	0,932	-20,3840	12,1840
	Sin sedación	-1,5000	3,81331	0,992	-12,0674	9,0674
	Sin cirugía	0,2000	3,81331	1,000	-9,6660	10,0660
	Curva estándar	-3,9000	3,81331	0,594	-12,7178	4,9178
Midazolam	Propofol	4,1000	3,81331	0,932	-12,1840	20,3840
	Sin sedación	2,6000	3,81331	0,985	-13,3763	18,5763
	Sin cirugía	4,3000	3,81331	0,901	-11,3743	19,9743
	Curva estándar	0,2000	3,81331	1,000	-15,0766	15,4766
Sin sedación	Propofol	1,5000	3,81331	0,992	-9,0674	12,0674
	Midazolam	-2,6000	3,81331	0,985	-18,5763	13,3763
	Sin cirugía	1,7000	3,81331	0,977	-7,3257	10,7257
	Curva estándar	-2,4000	3,81331	0,830	-10,1364	5,3364
Sin cirugía	Propofol	-0,2000	3,81331	1,000	-10,0660	9,6660
	Midazolam	-4,3000	3,81331	0,901	-19,9743	11,3743
	Sin sedación	-1,7000	3,81331	0,977	-10,7257	7,3257
	Curva estándar	-4,1000	3,81331	0,269	-10,4296	2,2296
Curva estándar	Propofol	3,9000	3,81331	0,594	-4,9178	12,7178
	Midazolam	-0,2000	3,81331	1,000	-15,4766	15,0766
	Sin sedación	2,4000	3,81331	0,830	-5,3364	10,1364
	Sin cirugía	4,1000	3,81331	0,269	-2,2296	10,4296

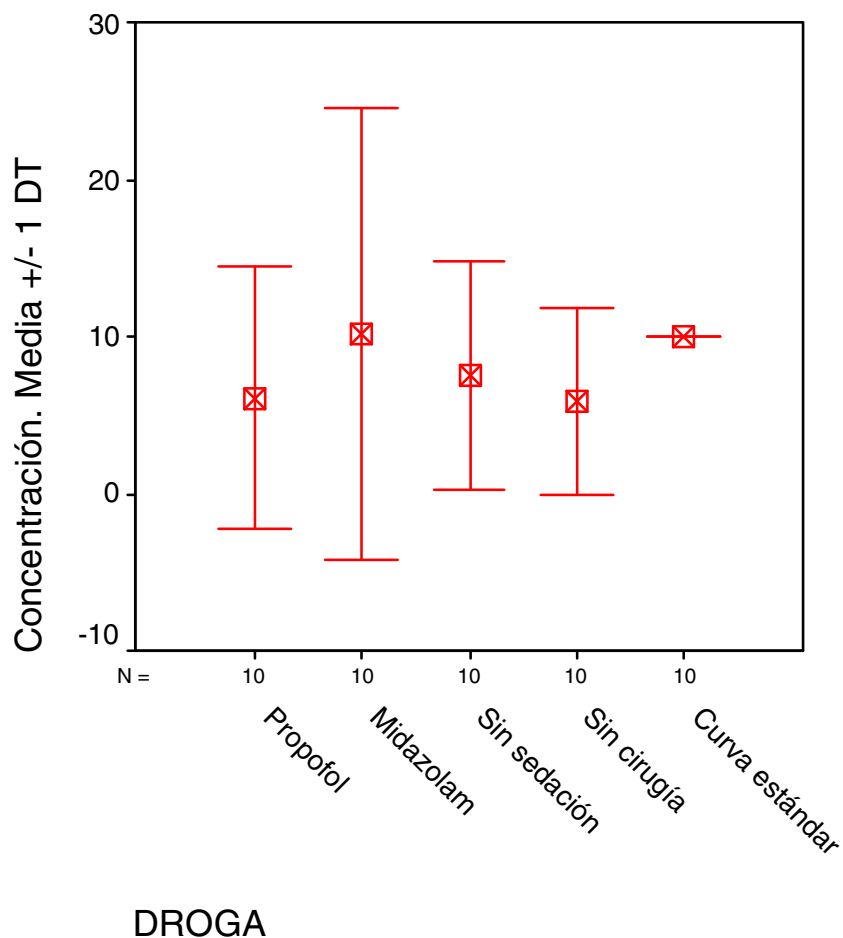


FIG. 17. MEDIA \pm 1 DESVIACIÓN TÍPICA DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS BASALES DE MELATONINA SEGÚN GRUPO DE ESTUDIO

4.2.3. ANOVA univariante de las concentraciones de melatonina en el minuto 10 tras iniciar la sedación

Las medias de las concentraciones plasmáticas de melatonina 10 minutos tras iniciar la sedación en cada grupo de estudio y el test de Games-Howell se describen en las tablas XX y XXI. En el último se aprecia que no existen diferencias significativas en el conjunto de valores entre el grupo sometido a sedación con propofol o midazolam, y la curva estándar ($p=0,066$ en el peor de los casos). En cambio, sí se estiman claras diferencias entre los grupos propofol y curva estándar, y el que no fue sometido a sedación pero sí a cirugía ($p<0,001$ y $p<0,000$, respectivamente). En el caso de los sujetos sometidos a sedación con midazolam al compararlos con los no sometidos a sedación no se consideran diferencias ($p=0,102$).

La aplicación del test de Games-Howell en lugar de la corrección de Bonferroni se explica porque al realizar la prueba de contraste de Levene sobre la igualdad de varianzas, éstas no resultan iguales ($p=0,000$).

La figura 18 manifiesta las medias ± 1 desviación típica de cada uno de los valores recogidos el minuto 10 tras iniciar la sedación.

TABLA XX. MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS PARA LOS VALORES DE MELATONINA PLASMÁTICA EN EL MINUTO 10 TRAS SEDACIÓN EN CADA GRUPO

	Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
DROGA			Límite inferior	Límite superior
Propofol	36,100	4,195	27,593	44,607
Midazolam	22,400	4,195	13,893	30,907
Sin sedación	6,100	4,195	-2,407	14,607
Curva estándar	40,000	4,195	31,493	48,507

TABLA XXI. COMPARACIONES MÚLTIPLES DE GAMES-HOWELL PARA LOS VALORES DE MELATONINA PLASMÁTICA EN EL MINUTO 10 TRAS SEDACIÓN EN CADA GRUPO

		Diferencia medias I-J	Error típico	Significación	Intervalo de confianza 95%	
(I) DROGA	(J) DROGA				Límite inferior	Límite superior
Propofol	Midazolam	13,7000	5,93212	0,358	-9,2499	36,6499
	Sin sedación	30,0000	5,93212	0,001	12,4730	47,5270
	Curva estándar	-3,9000	5,93212	0,890	-21,0016	13,2016
Midazolam	Propofol	-13,7000	5,93212	0,358	-36,6499	9,2499
	Sin sedación	16,3000	5,93212	0,102	-2,7535	35,3535
	Curva estándar	-17,6000	5,93212	0,066	-36,2856	1,0856
Sin sedación	Propofol	-30,0000	5,93212	0,001	-47,5270	-12,4730
	Midazolam	-16,3000	5,93212	0,102	-35,3535	2,7535
	Curva estándar	-33,9000	5,93212	0,000	-40,5541	-27,2459
Curva estándar	Propofol	3,9000	5,93212	0,890	-13,2016	21,0016
	Midazolam	17,6000	5,93212	0,066	-1,0856	36,2856
	Sin sedación	33,9000	5,93212	0,000	27,2459	40,5541

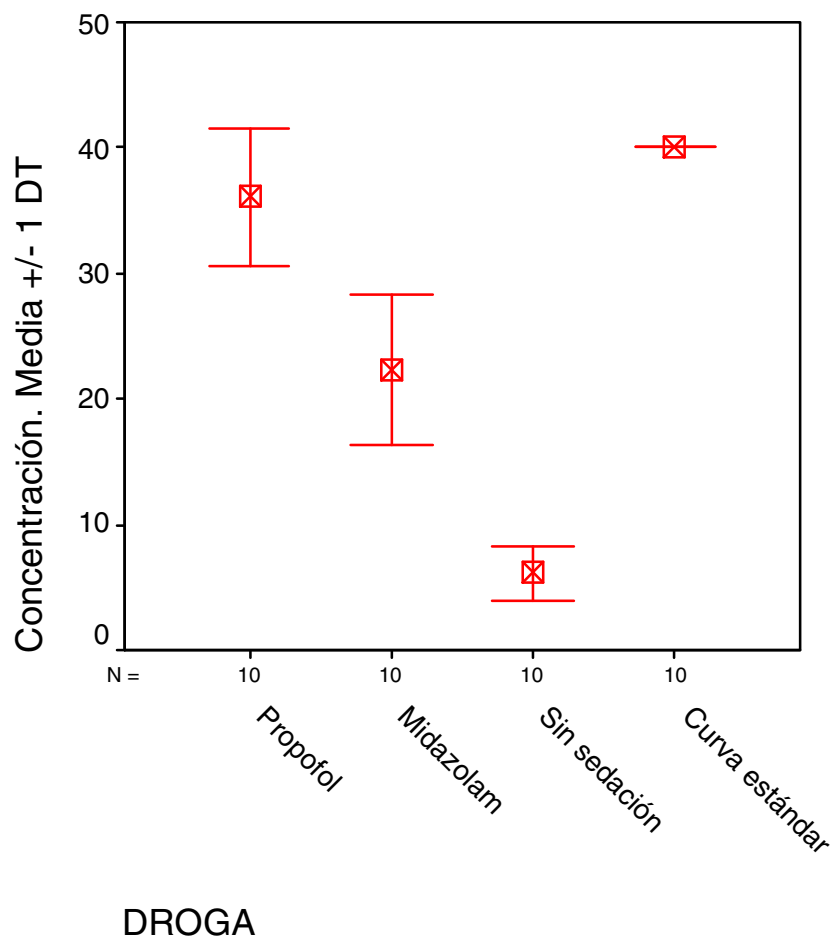


FIG. 18. MEDIA \pm 1 DESVIACIÓN TÍPICA DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE MELATONINA EN EL MINUTO 10 TRAS INICIAR LA SEDACIÓN SEGÚN GRUPO DE ESTUDIO

4.2.4. ANOVA univariante de las concentraciones de melatonina en el minuto 60 tras iniciar la sedación

Las medias de las concentraciones plasmáticas de melatonina 60 minutos tras iniciar la sedación en cada grupo de estudio se describen en la tabla XXII. Como puede verse en la siguiente tabla (tabla XXIII), el test de Games-Howell para comparaciones múltiples muestra que no existen diferencias en el conjunto de valores de la variable entre el grupo sometido a sedación con propofol o midazolam, y el no sometido a sedación ($p=0,491$ en el peor de los casos). Respecto a la curva estándar, no existen diferencias con propofol ($p=0,066$), pero sí con midazolam y el grupo sin sedación ($p=0,005$ y $p<0,000$, respectivamente). La aplicación del test de Games-Howell en lugar de la corrección de Bonferroni sigue los mismos criterios que en el apartado anterior para $p=0,003$.

Las medias ± 1 desviación típica de cada uno de los valores recogidos el minuto 60 tras iniciar la sedación se ven representadas en la figura 19.

TABLA XXII. MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS PARA LOS VALORES DE MELATONINA PLASMÁTICA EN EL MINUTO 60 TRAS SEDACIÓN EN CADA GRUPO

	Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
DROGA			Límite inferior	Límite superior
Propofol	19,800	4,501	10,672	28,928
Midazolam	14,500	4,501	5,372	23,628
Sin sedación	9,300	4,501	0,172	18,428
Curva estándar	40,000	4,501	30,872	49,128

TABLA XXIII. COMPARACIONES MÚLTIPLES DE GAMES-HOWELL PARA LOS VALORES DE MELATONINA PLASMÁTICA EN EL MINUTO 60 TRAS SEDACIÓN EN CADA GRUPO

		Diferencia medias I-J	Error típico	Significación	Intervalo de confianza 95%	
(I) DROGA	(J) DROGA				Límite inferior	Límite superior
Propofol	Midazolam	5,3000	6,36492	0,929	-19,6124	30,2124
	Sin sedación	10,5000	6,36492	0,491	-11,2641	32,2641
	Curva estándar	-20,2000	6,36492	0,066	-41,7019	1,3019
Midazolam	Propofol	-5,3000	6,36492	0,929	-30,2124	19,6124
	Sin sedación	5,2000	6,36492	0,806	-12,1192	22,5192
	Curva estándar	-25,5000	6,36492	0,005	-42,4349	-8,5651
Sin sedación	Propofol	-10,5000	6,36492	0,491	-32,2641	11,2641
	Midazolam	-5,2000	6,36492	0,806	-22,5192	12,1192
	Curva estándar	-30,7000	6,36492	0,000	-37,0647	-24,3353
Curva estándar	Propofol	20,2000	6,36492	0,066	-1,3019	41,7019
	Midazolam	25,5000	6,36492	0,005	8,5651	42,4349
	Sin sedación	30,7000	6,36492	0,000	24,3353	37,0647

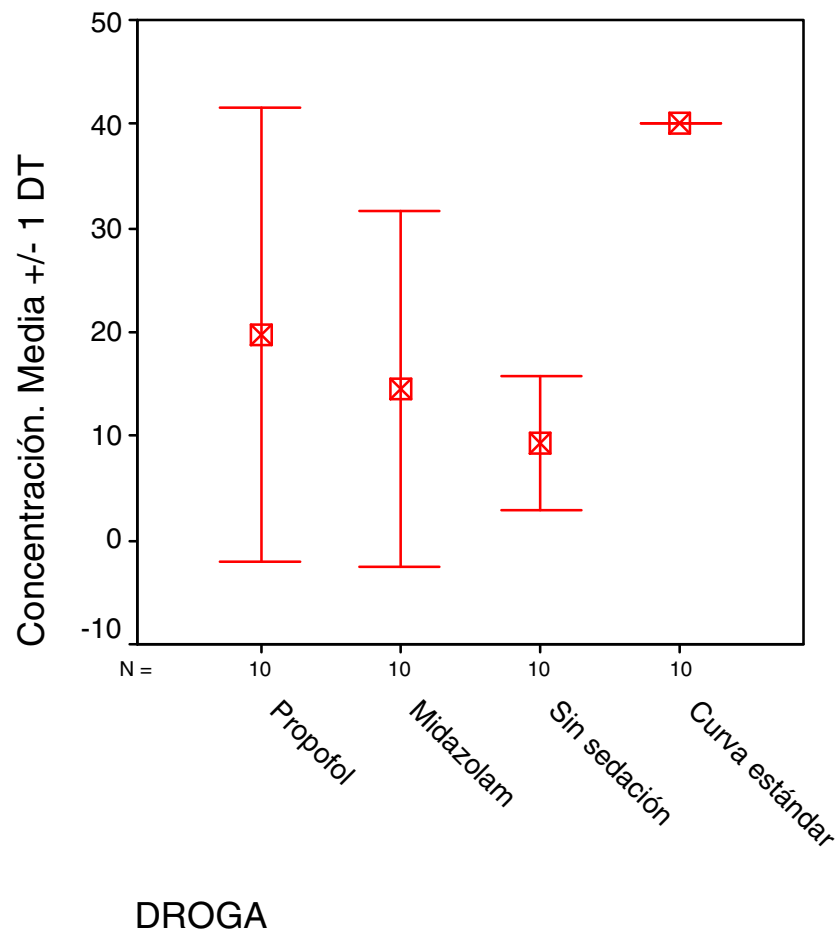


FIG. 19. MEDIA \pm 1 DESVIACIÓN TÍPICA DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE MELATONINA EN EL MINUTO 60 TRAS INICIAR LA SEDACIÓN SEGÚN GRUPO DE ESTUDIO

4.2.5. ANOVA univariante de las concentraciones de melatonina en el minuto 90 tras retirar la sedación

La tabla XXIV detalla las medias de las concentraciones plasmáticas de melatonina a los 90 minutos tras retirar la sedación en cada grupo de estudio. Como puede apreciarse en la tabla XXV, el test de Games-Howell para comparaciones múltiples muestra que no existen diferencias significativas en los valores entre los diferentes grupos:

- Sometido a sedación con propofol.
- Sometido a sedación con midazolam.
- No sometidos a sedación.
- Curva estándar.

siendo $p > 0,093$ en el peor de los casos.

La aplicación del test de Games-Howell sigue idénticos criterios que en apartados anteriores ($p = 0,000$).

La figura 20 describe las medias ± 1 desviación típica de los valores registrados 90 minutos tras retirada la sedación en cada grupo de estudio.

TABLA XXIV. MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS PARA LOS VALORES DE MELATONINA PLASMÁTICA EN EL MINUTO 90 TRAS RETIRAR LA SEDACIÓN EN CADA GRUPO

	Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
DROGA			Límite inferior	Límite superior
Propofol	36,700	6,851	22,805	50,595
Midazolam	23,600	6,851	9,705	37,495
Sin sedación	8,200	6,851	-5,695	22,095
Curva estándar	10,000	6,851	-3,895	23,895

TABLA XXV. COMPARACIONES MÚLTIPLES DE GAMES-HOWELL PARA LOS VALORES DE MELATONINA PLASMÁTICA EN EL MINUTO 90 TRAS RETIRAR LA SEDACIÓN EN CADA GRUPO

		Diferencia medias I-J	Error típico	Significación	Intervalo de confianza 95%	
(I) DROGA	(J) DROGA				Límite inferior	Límite superior
Propofol	Midazolam	13,1000	9,68908	0,772	-25,4782	51,6782
	Sin sedación	28,5000	9,68908	0,093	-4,3028	61,3028
	Curva estándar	26,7000	9,68908	0,118	-6,0154	59,4154
Midazolam	Propofol	-13,1000	9,68908	0,772	-51,6782	25,4782
	Sin sedación	15,4000	9,68908	0,354	-11,7879	42,5879
	Curva estándar	13,6000	9,68908	0,441	-13,4764	40,6764
Sin sedación	Propofol	-28,5000	9,68908	0,093	-61,3028	4,3028
	Midazolam	-15,4000	9,68908	0,354	-42,5879	11,7879
	Curva estándar	-1,8000	9,68908	0,702	-6,9360	3,3360
Curva estándar	Propofol	-26,7000	9,68908	0,118	-59,4154	6,0154
	Midazolam	-13,6000	9,68908	0,441	-40,6764	13,4764
	Sin sedación	1,8000	9,68908	0,702	-3,3360	6,9360

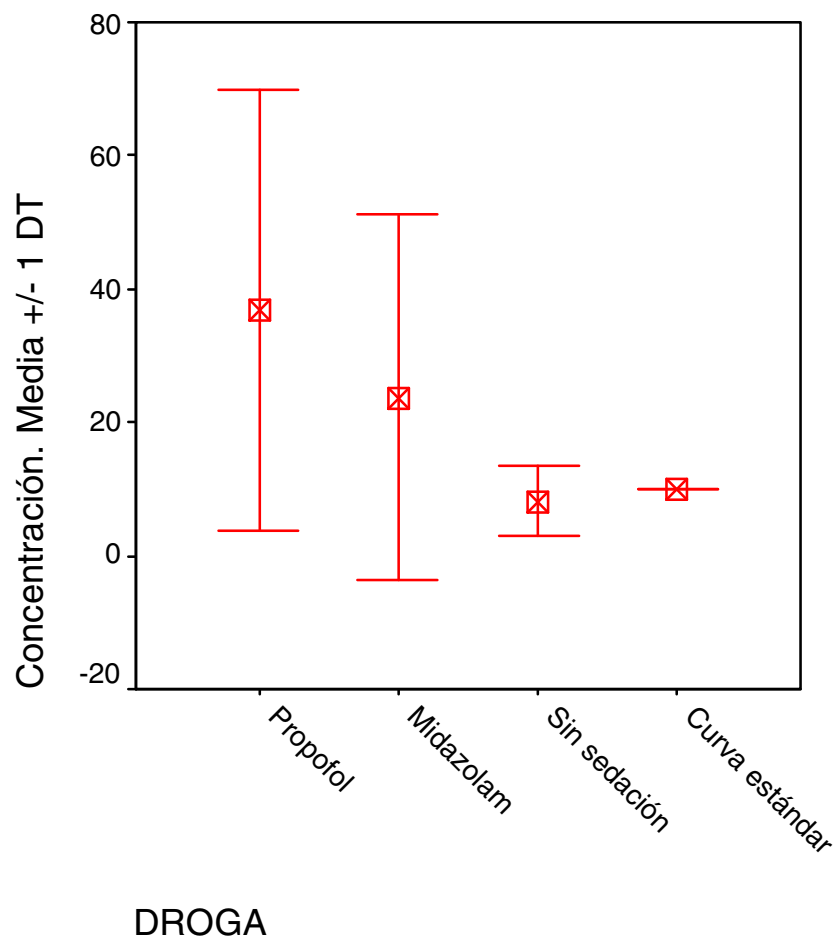


FIG. 20. MEDIA \pm 1 DESVIACIÓN TÍPICA DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE MELATONINA EN EL MINUTO 90 TRAS RETIRAR LA SEDACIÓN SEGÚN GRUPO DE ESTUDIO

En cuanto a la interpretación de los resultados de la estadística, se puede concluir que no existieron diferencias entre los distintos grupos de estudio en cuanto a *edad, género y duración de las diferentes cirugías*. Lo mismo puede observarse respecto a los valores basales, por lo que se puede afirmar que *las muestras fueron obtenidas en las condiciones idóneas*.

También se puede aseverar que *no hubo influencia del estrés anestésico-quirúrgico sobre la detección de los valores de la hormona melatonina*, puesto que en ningún momento los valores obtenidos del grupo no sometido a sedación pero sí a cirugía sobrepasaron el rango de niveles basales y la comparación con la curva estándar indica claras diferencias significativas ($p=0,000$).

Parece que el *propofol* incrementa los niveles plasmáticos de melatonina, ya que se aprecia un pico de la hormona 10 minutos tras iniciarse la sedación con esta droga. Esto se deduce porque al comparar los valores obtenidos en este momento con los de una curva estándar ideal no se estiman diferencias significativas, y claramente sí, al hacerlo con el grupo no sometido a sedación.

A los 60 minutos de iniciarse la hipnosis no se observan diferencias entre los grupos sometidos a sedación con propofol o midazolam y el grupo no sometido a sedación. Aunque se considera clara significación estadística al comparar los colectivos correspondientes a midazolam y sin sedación con el correspondiente a la curva estándar, curiosamente no sucede lo mismo al hacerlo entre esta última y el sometido a sedación

con propofol, pero para una $p=0,066$, es decir, muy próxima a la diferencia estadísticamente significativa.

Respecto al otro hipnótico, es decir *midazolam*, tanto observando los valores de melatonina en plasma en los distintos tiempos de una forma global, como de manera independiente, *puede concluirse que el fármaco no provoca una elevación de las concentraciones sanguíneas de la hormona.*

DISCUSIÓN

5.DISCUSIÓN

Nuestra hipótesis plantea si la melatonina puede estar implicada en el mecanismo de acción de sustancias con capacidad hipnótica que se utilizan en anestesia y no observar las posibles alteraciones del ritmo circadiano de la hormona. La originalidad de este trabajo radica en que son escasas las publicaciones que evalúan los cambios plasmáticos de melatonina en humanos frente a la administración intravenosa de drogas hipnóticas. La mayoría de las determinaciones sobre los niveles plasmáticos de melatonina están realizadas sobre animales de experimentación o no están efectuadas en condiciones idóneas para valorar la actividad de estas sustancias sobre la glándula pineal.

Se han realizado estudios en ratas del efecto de sustancias psicotrópicas sobre la síntesis de melatonina¹⁵¹ que parecen demostrar alteraciones en la sensibilidad de los receptores adrenérgicos en la glándula pineal de estos roedores.

También se han publicado artículos sobre pacientes sedados en unidades de cuidados intensivos y las alteraciones registradas sobre la secreción de la hormona. Olofsson et al.¹⁵² estudiaron grupos de pacientes sedados con midazolam y propofol pero ambos fármacos eran empleados junto a fentanilo, lo que puede contaminar los resultados por la acción del opioide. Asimismo, Mundigler et al.¹⁵³ realizaron su trabajo con midazolam asociado a sufentanilo. Debido al empleo de opiáceos, a la gran cantidad de drogas

administradas en este tipo de pacientes, las variadas técnicas invasivas, así como a su estado general, la valoración de los resultados obtenidos se encuentra dificultada por la existencia de múltiples sesgos.

La elección de los fármacos empleados en nuestro estudio, midazolam y propofol, se realizó en el caso del primero, porque su mecanismo de acción sobre la actividad del GABA es bien conocida desde hace tiempo y existen publicaciones referentes a la acción de las benzodiacepinas en la epífisis, ya que ésta presenta receptores gabaérgicos^{154,155}. En el caso de la segunda, porque su relación con el receptor del GABA es reciente y posiblemente quedan por dilucidar otros mecanismos de acción alternativos.

Las investigaciones realizadas actualmente parecen indicar que algunas benzodiacepinas y concretamente alprazolam en humanos¹⁵⁶, y diazepam tanto en ratas¹⁵⁷ como en humanos¹⁵⁸, incluso en dosis únicas, pueden llegar a inhibir la secreción de melatonina por parte de la glándula pineal. En cambio, en estudios realizados sobre ratas en vivo¹⁵⁹, algunos metabolitos del diazepam empleados en clínica como el nordiazepam, oxazepam y temazepam, no parecen afectar la secreción de melatonina.

En cuanto al tipo de anestesia, existen divergencias entre los distintos autores sobre la forma en la que afecta la anestesia general o regional a los patrones de liberación de melatonina en humanos. Nishimura et al.¹⁶⁰ no encontraron alteraciones significativas en el ritmo circadiano de la hormona tras el empleo de anestesia general, mientras que

Reber et al.¹⁶¹ estudiaron las concentraciones plasmáticas de melatonina en sujetos anestesiados con isoflurano y propofol, apreciando un incremento en este alcaloide indólico, aún mayor en el primer grupo. Como explicación a las diferencias encontradas en los niveles de melatonina sugieren la posibilidad de una modulación en la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de la hormona. Kärkelä et al.¹⁶² hicieron un trabajo en el que compararon un grupo de pacientes sometidos a anestesia general con otro al que se le practicó anestesia espinal, hallando en ambos grupos niveles disminuidos de melatonina en saliva. No encontraron diferencias significativas respecto al tipo de anestesia. Estos autores emplearon premedicación y analgesia postoperatoria con oxycodona, y para el mantenimiento de la anestesia general isoflurano y fentanilo. Los hallazgos obtenidos son de difícil explicación, puesto que según las conclusiones de Reber et al.¹⁶¹ en 1998, el isoflurano parece poseer un importante efecto potenciador sobre la liberación del alcaloide indólico. Lo mismo ocurre con la morfina en ratas, viéndose sus efectos bloqueados por la naloxona^{163,164}.

En nuestras condiciones de experimentación clínica hemos realizado anestesia intrarraquídea, que difícilmente puede afectar por sí misma los niveles sanguíneos de melatonina, sobre todo, cuando se utilizó para nuestro estudio un anestésico local sin ningún tipo de fármaco adyuvante. El fentanilo, muy empleado en anestesia espinal para potenciar el efecto de los anestésicos locales, fue desestimado para evitar posibles interferencias. Habitualmente se prescriben benzodiacepinas previas a la intervención

quirúrgica, para que los pacientes acudan más tranquilos a quirófano el día del acto quirúrgico. No administramos ningún tipo de premedicación para mantener el ritmo sueño-vigilia, y por tanto los niveles plasmáticos de melatonina en los distintos sujetos

Previamente a la extracción de las muestras sanguíneas postoperatorias tampoco se administró medicación analgésica alguna que pudiera alterar los valores de la hormona en cuestión.

Los grupos del estudio se diseñaron para comparar los dos hipnóticos en igualdad de condiciones entre sí y con un grupo control sometido a idénticas intervenciones quirúrgicas pero no a sedación, para corroborar que las posibles apreciaciones en los cambios de la hormona eran realmente debidos a las drogas y no al proceso quirúrgico en sí. Además, los valores basales de todos los grupos se contrastaron con un grupo de valores basales de voluntarios sanos, no sometidos a intervención ni a sedación, que se introdujeron en el estudio en iguales condiciones que el resto de los grupos, tanto en lo referente a criterios de inclusión, como de tamaño y recogida de muestras, etc.; esto se hizo para soslayar las posibles interferencias del estrés quirúrgico en los valores basales del ensayo.

En cuanto al tipo de cirugía, Nishimura et al.¹⁶⁰ no detectaron alteraciones significativas en el patrón de secreción de melatonina en cirugía tan invasiva como la esofagectomía con toracotomía, mientras que Vician et al.¹⁶⁵ en 1999 encontraron niveles nocturnos incrementados de la hormona en pacientes sometidos a cirugía para

cáncer colorrectal. Sugirieron que el ascenso del alcaloide indólico podría ser consecuencia de la liberación de melatonina a la circulación por parte del intestino, o bien, a un aumento de la producción de la hormona por estimulación de la glándula pineal. Reber et al.¹⁶¹ realizaron su trabajo sobre cirugía laparoscópica ginecológica electiva, hallando niveles de melatonina aumentados y Kärkelä et al.¹⁶² en 2002 encontraron un retraso en el pico nocturno de la hormona en la primera noche tras cirugía ortopédica menor para reparación de ligamentos de la rodilla.

Nosotros optamos por cirugía traumatológica programada de miembros inferiores desde rodilla hasta pie, porque ésta da opción a la realización de anestesia regional, evitando el emplear anestesia general, que podría afectar a las determinaciones por el tipo de fármacos empleados en ella. Además se escogieron intervenciones de mediana entidad para que así se viese perturbada en la menor medida posible la homeostasis de los individuos. La duración mínima de cada acto quirúrgico debía ser de 60 min, ya que se pretendían extraer dos muestras durante la hipnosis, la primera a los 10 min y la segunda a los 60 min, para recoger por duplicado un posible ascenso en los niveles plasmáticos de melatonina con las drogas empleadas para sedación, y teniendo en cuenta que la vida media plasmática de la hormona es de 47 min, poder observar posibles picos de liberación. También se evitaron cirugías con duración superior a las dos horas que pudieran afectar el ensayo por acumulación de las drogas en tejido graso y recirculación, y/o el equilibrio general de los incluidos en el estudio. Las intervenciones fueron

realizadas entre las 12:00 h y las 17:00 h, precisamente para intentar apreciar al máximo los posibles ascensos de los niveles de la hormona debidos al fármaco, justamente cuando más bajos están según el ritmo circadiano.

En nuestro trabajo, la perfusión continua intravenosa de propofol provoca un pico plasmático inicial de melatonina, pero sus concentraciones caen aunque los niveles del fármaco permanezcan estables. Una posible interpretación a todo esto sería que propofol provoca una liberación brusca de la hormona que agota las reservas celulares y que es muy distinta a la producción progresiva del alcaloide indólico que se realiza para el sueño natural durante la noche. En estas condiciones no puede secretarse más melatonina por mucho que el fármaco continúe actuando sobre la pineal, disminuyendo su detección en sangre.

Reber et al.¹⁶¹ encuentran niveles plasmáticos de melatonina elevados y mantenidos durante toda la cirugía tras anestesia general con propofol, fentanilo y vecuronio. Este grupo emplea dosis mucho más elevadas de propofol (de 10 a 6 mg/kg/h) que nosotros (de 3 a 4 mg/kg/h), ya que someten a los pacientes a anestesia y no a sedación, y además el empleo de fentanilo per se puede aumentar los niveles de la hormona, como se ha comentado previamente en este mismo apartado.

Volviendo a nuestro estudio, pasadas dos semividas plasmáticas de la hormona, es decir 90 minutos tras retirar la sedación con propofol, aunque en valor absoluto los valores de melatonina no vuelven a ser iguales a los basales, puede decirse que no

existen diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y el no sometido a sedación, o grupo de control de valores basales intraoperatorio ($p=0,93$). Este hallazgo coincide con las determinaciones de Reber et al.¹⁶¹, aunque ellos explican este fenómeno por la actividad de la luz sobre la glándula pineal en la sala de recuperación. Nosotros además barajamos la posibilidad de que esta apreciación pueda ser explicada por la disminución o cese en la producción y/o liberación de la hormona una vez que se interrumpe la administración de propofol, con el consecuente decremento de la hormona por su degradación metabólica.

Actualmente existen preparados comerciales para detección de melatonina en saliva humana (IBL), con sensibilidad y especificidad similar a la técnica de detección por ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) sérica, pero en el momento de realización de este trabajo no estaban disponibles. En referencia al empleo de ELISA plasmática respecto a RIA (Radio Immuno Assay), sus características técnicas son similares, como se refleja en el apartado material y métodos y en las tablas II a VIII, y además, el empleo de sustancias radiactivas es contaminante, requiere permisos especiales y laboratorios adecuados a tal efecto, siendo más compleja su utilización.

De todo lo anterior se deduce que los agentes hipnóticos podrían tener otro posible mecanismo de acción y que en trabajos posteriores cabría la posibilidad de desarrollar fármacos con mayor especificidad y menos efectos secundarios tanto en el campo de la anestesia como en el de los psicofármacos¹⁶⁶. Asimismo, si la inducción de sueño

artificial está relacionada con el incremento de la síntesis de melatonina, como parece desprenderse de lo expuesto previamente, al menos en lo que respecta a propofol, podría incrementarse el empleo de la hormona con fines terapéuticos e incluso potenciarse el desarrollo de sustancias análogas con mayor eficacia.

Harán falta estudios ulteriores para aclarar la actividad de estas drogas sobre la epífisis.

TESIS Y CONCLUSIONES

6.TESIS Y CONCLUSIONES

En cuanto a la hipótesis planteada, podemos asegurar que la melatonina no está implicada en la actividad de todas las sustancias hipnóticas, aunque sí actúa como mediador de propofol, un agente hipnótico empleado en anestesia y cuyo mecanismo de acción conocido es a nivel del receptor del GABA.

En la actualidad prácticamente no existen estudios que evalúen otro posible mecanismo de acción de los hipnóticos mediado por el incremento en las concentraciones plasmáticas o el aumento en la actividad de la hormona producida en la pineal.

De acuerdo con los objetivos del estudio y los resultados obtenidos alcanzamos las siguientes conclusiones:

1. La relación de la melatonina con el sueño artificial queda demostrada con propofol, no ocurriendo lo mismo en el caso de midazolam.
2. Propofol provoca un incremento de las concentraciones sanguíneas de melatonina. La perfusión continua intravenosa de este fármaco induce un pico

plasmático que no se mantiene en el tiempo a pesar de que continúe administrándose la droga, volviendo los valores de la hormona hasta concentraciones prácticamente basales.

Midazolam, una benzodiacepina hidrosoluble con acción gabaérgica, no aumenta los niveles sanguíneos de melatonina, pero tampoco los disminuye como hacen sus análogos liposolubles, según refiere la literatura.

3. En referencia a la relación causa-efecto entre la administración de las drogas y los cambios de melatonina en plasma, ésta queda demostrada con propofol, ya que el ascenso en los niveles de la hormona coincide con el inicio de su perfusión intravenosa y los valores vuelven a rango basal tras dos semividas plasmáticas de la misma, una vez terminada la infusión. Con midazolam no observamos ningún cambio y, evidentemente, no podemos reflejar estas conclusiones.

Asimismo, si la inducción de sueño artificial está relacionada con el incremento de la síntesis de melatonina, podría potenciarse el desarrollo de sustancias hipnóticas análogas con mayor eficacia y menos efectos adversos.

BIBLIOGRAFÍA

7.BIBLIOGRAFÍA

¹ Garfinkel D, Laudon M, Noj D, Zisapel N. Improvement of sleep quality in elderly people by controlled- release melatonin. Lancet 1995;346:541-544.

² Dawson D, Encel N. Melatonin and sleep in humans. J Pineal Res 1993;15(1):1-12.

³ Meissl H, Yanez J. Pineal photosensitivity. A comparison with retinal photoreception. Acta Neurobiol Exp 1994;54:19-29.

⁴ Silver R, Le Sauter J. Efferent signals of the suprachiasmatic nucleus. J Biol Rythms 1993;8:89-92.

⁵ García-Patterson A, Puig-Domingo M, Webb SM. Thirty years of pineal research: do we know its clinic relevance? J Pineal Res 1996;20(1):1-6.

⁶ Reiter RJ. The pineal gland: A regulator of regulators. Progress in Psychobiology and Physiological Psychology 1980;9:323-355.

⁷ Humbert W, Pevet P. The decrease of pineal melatonin production with age. Causes and consequences. *Ann N Y Acad Sci* 1994;719:43-63.

⁸ Reiter RJ. Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp* 1994;54:31-9.

⁹ Reiter RJ. Action spectra, dose-response relationships, and temporal aspects of light's effects on the pineal gland. *Ann N Y Acad Sci* 1985;453:215-30.

¹⁰ Loscher W, Mevissen M. Animal studies on the role of 50-60 Hz magnetic fields in carcinogenesis. *Life Sci* 1994;54(21):1531-43.

¹¹ Reiter RJ. Static and extremely low frequency electromagnetic field exposure: reported effects on the circadian production of melatonin. *J Cell Biochem* 1993;51(4):394-403.

¹² Reiter RJ, Richardson BA. Some perturbations that disturb the circadian melatonin rhythm. *Cronobiol Int* 1992;9(4):314-21.

¹³ Saletu B. Therapy for sleep disorders in depressives. *Psychopathology* 1986;19:239-62.

- ¹⁴ Harma M. Shift work, jet-lag and sleep. *Duodecim* 1991;107(18):1469-71.
- ¹⁵ Comperatore CA, Krueger GP. Circadian rhythm desynchronization, jet lag, shift lag and coping strategies. *Occup Med* 1990;5(2): 323-41.
- ¹⁶ Waldhauser F, Ehrhart B, Forster E. Clinical aspects of the melatonin action: impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia* 1993;49(8):671-81.
- ¹⁷ Nair NP, Sharma M. Neurochemical and receptor theories of depression. *Psychiatr J Uni Ott* 1989;14(2):328-51.
- ¹⁸ Morguenstern EA. Neuroendocrine and psychopharmacologic aspects of the pineal function. Melatonin and psychiatric disorders. *Acta Psiquiatr Psicol Am Lat* 1989;35:71-9.
- ¹⁹ Smythies JR. Biochemical abnormalities associated with schizophrenia. *Br J Psychiatry* 1975;9:41-7.
- ²⁰ Sandyk R, Kay SR. Pineal melatonin in schizophrenia: a review and hypothesis. *Schizophr Bull* 1990;16:653-62.

- ²¹ Alexander H, Manz B, et al. Serum melatonin concentration in gynaecological practice and the influence of MLT on mononuclear cells in vitro. In Murison R (ed): Endocrine and Nutricional Control of Basic Biological Functions. Toronto, Canadá 1991. Hogrefe & Huber publishers; p. 491-496.
- ²² Gandar R, Collin D. Functional hypothalamic amenorrheas. I Physiopathology. J Gynaecol Obstet Biol Reprod 1993;22(2):127-32.
- ²³ Rosenthal NE, Genhart M, Jacobsen FM, et al. Disturbances of appetite and weight regulation in seasonal affective disorders. Ann N Y Acad Sci 1987;499:216-30.
- ²⁴ Parienti V, Kennedy SH, Brown GM, et al. Bulimia, bulimia-anorexia and nocturnal secretion of melatonin and cortisol. Encephale 1988;14(6):421-5.
- ²⁵ Bartsch C, Bartsch H, Fluchter SH, et al. Diminished pineal function coincides with disturbed circadian endocrine rythmicity in untreated primary cancer patients. Consequence of premature aging or of tumor growth?. Ann N Y Sci 1994;719:502-25.

-
- ²⁶ Cavallo A. Melatonin and human puberty: current perspectives. *J Pineal Res* 1993;15(3):115-21.
- ²⁷ Tzischinsky O, Lavie P. Melatonin possesses time-dependent hypnotic effects. *Sleep* 1994;17:638-645.
- ²⁸ Sugden D. Sedative potency and 2-[125 I]-iodomelatonin binding affinity of melatonin analogues. *Psychopharmacology Berl* 1995;117:364-370.
- ²⁹ Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, et al. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther* 1995;57:552-558.
- ³⁰ Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, et al. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Sci* 1994;719:1-12.
- ³¹ Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, et al. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res* 1993;14(4):151-68.

- ³² Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995;18:1-11.
- ³³ Caroleo MC, Frasca D, Nistico G, et al. Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacol* 1992;23:81-89.
- ³⁴ Maestroni GJ. Therapeutic potencial of melatonin in immunodeficiency states, viral disease and cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:217-26.
- ³⁵ Regelson W, Pierpaoli W. Melatonin: a rediscovered antitumor hormone? Its relation to surface receptors; sex steroid metabolism, immunologic response, and chronobiologic factors in tumor growth and therapy. *Cancer Invest* 1987;5(4):379-85.
- ³⁶ Kerenyi NA, Pandula E, Feuer GM. Oncostatic effects of the pineal gland. *Drug Metabol Drug Interact* 1990;8:313-9.
- ³⁷ Bartsch C, Bartsch H, Lippert TH. Role of the pineal body in reproduction and in gynaecologic tumors. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1991;51(1):1-8.

-
- ³⁸ Damian E. Pineal compounds with antigonadotropic activity. *Endocrinologie* 1978;16(1):3-10.
- ³⁹ Reiter RJ, Vaughan MK. Pineal antigonadotropic substances: polypeptides and indoles. *Life Sci* 1977;21(2):159-71.
- ⁴⁰ Angeli A, Gatti G, Sartori M, et al. Effect of exogenous melatonin on human natural killer cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland. En Müller and Bass eds.: *The Pineal Gland and Cancer*. Tubingen 1988;145-57.
- ⁴¹ Poon AM, Liu ZM, Pang CS, et al. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. *Biol Signals* 1994;3(2):107-17.
- ⁴² Arias J, Melean E, Valero N, et al. Efecto de la melatonina en la proliferación linfocitaria y la producción de IL-2 e IL-1b en esplenocitos de ratones. *Invest Clin* 2003;44(1):41-50.
- ⁴³ Preslock JP. Gonadal steroid regulation of pineal melatonin synthesis. *Life Sci* 1977;20(8):1299-304.
- ⁴⁴ Cardinali DP, Vacas MI. Feedback control of pineal function by reproductive hormones—a neuroendocrine paradigm. *J Neural Transm* 1978;(13):175-201.

- ⁴⁵ Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. J Pineal Res 1993;14(1):1-10.
- ⁴⁶ Robbins SL, Cotran RS. Sistema endocrino. En Robbins SL, Cotran RS, eds.: Patología Estructural y Funcional. Interamericana. EMALSA, S.A. Madrid 1984;1239-1312.
- ⁴⁷ Bloom W, Fawcett W. Glándula Pineal. En Bloom W, Fawcett W, eds.: Tratado de Histología. Editorial Labor S.A. Barcelona 1981;558-64.
- ⁴⁸ De Martino C et al. Electron microscopic study of impuberal and adults rats, pineal body. Experientia 1964;20:556.
- ⁴⁹ Korf HV. The pineal organ as a component of the biological clock. Phylogenetic and ontogenic considerations. Ann N Y Acad Sci 1994;719:13-42.
- ⁵⁰ Orts F. Diencéfalo o cerebro medio. En Orts F, ed.: Anatomía Humana. Editorial Científico Médica. Barcelona 1982;197-215.
- ⁵¹ Ferner H, Staubesand J. Encéfalo, meninges, vasos sanguíneos. En Sobotta J, ed.: Atlas de Anatomía 1. Editorial Médica Panamericana. Madrid 1982;33-116.

- ⁵² Greene NM. A consideration of factors in the discovery of anesthesia and their effects on its development. *Anesthesiology* 1971;35:515-19.
- ⁵³ Calverley RK. Anesthesia as a speciality: Past, present and future. In: Barash PG ed. *Clinical Anesthesia*. JB Lippincott Company Ed. Philadelphia 1992;3-34.
- ⁵⁴ Snow J. On chloroform and other anesthetics. In: Churchill J. London 1858; 58-74.
- ⁵⁵ Smith TC, Wollman H. Historia y principios de la Anestesiología. En: Goodman and Gilman eds. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Editorial Panamericana. México 1986; 261-75.
- ⁵⁶ Corning JL. Spinal anesthesia and local medication of the cord. *N Y Med J* 1885;42:483.
- ⁵⁷ Quincke H. Die lumbalpunktion des hydrocephalus. *Ber Klin Wochenschr* 1891;28:929.
- ⁵⁸ Raymond B. Historia del bloqueo nervioso. En Cousins MJ, Bridenbaugh PO, eds: *Bloqueos nerviosos en anestesia clínica y tratamiento del dolor*. Ediciones Doyma S.A. Barcelona 1991;3-22.

-
- ⁵⁹ Fraschini F, Stankov B. High affinity melatonin receptors in the vertebrate brain: implications for the control of the endogenous oscillatory systems. *Chronobiologia* 1994;21:89-92.
- ⁶⁰ Schiller F. Pineal gland, perennial puzzle. *J Hist Neurosci* 1995;4:155-65.
- ⁶¹ Descartes R. Tratado del Hombre. En Adam & Tannery eds: *Oeuvres de Descartes*. 2ª ed. (13 vols.) Vrin. Charles Angot. París 1964-74; vol XI.
- ⁶² Wharton T. *Adenographia sive glandularum totius corporis descriptio*. J.G. Londres 1656.
- ⁶³ Cousin J. *An kwna' rion sensus commnunis sedes?* Tesis presentada en la Escuela de Medicina de París en 1641; Catálogo de la Biblioteca Nacional, París, nº36869415.
- ⁶⁴ Cousin J. *An Hypercatharsi theriaca?* Tesis presentada en la Escuela de Medicina de París en 1642a; Catálogo de la Biblioteca Nacional, París, nº36869416.
- ⁶⁵ Cousin J. *An senibus calidus, humidusque victus?* Tesis presentada en la Escuela de Medicina de París en 1642b; Catálogo de la Biblioteca Nacional, París, nº36869417.

-
- ⁶⁶ Cousin J. Novum asthma novis signis novan causam arguentibus novissime detectum. JB Coignard. París 1673; Catálogo de la Biblioteca Nacional, París, nº30281955.
- ⁶⁷ Lockhorst GJC, Kaitaro TT. The originality of Descartes' theory about the pineal gland. J Hist Neuros 2001;10(1):6-18.
- ⁶⁸ Reiter RJ. Comparative physiology: pineal gland. Annu Rev Physiol 1973;35:305.
- ⁶⁹ Goldstein R. Arginine-vasotocin (AVT)—a pineal hormone in mammals. Rom J Endocrinol 1992;30:21-44.
- ⁷⁰ Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor the lightens melanocytes. J Am Chem Soc 1958;80:2587.
- ⁷¹ Lerner AB, Case JD, Mori, et al. Melatonin in peripheral nerve. Nature 1959;183:1821.
- ⁷² Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-metoxindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. J Biol Chem 1960;235:1992-7.
- ⁷³ Mori W, Lerner AB. A microscopic bioassay for melatonin. Endocrinology 1960;67:443-50.

⁷⁴ Barchas JD, Lerner AB. Localization of melatonin in the nervous system. *J Neurochem* 1964;11:489-91.

⁷⁵ Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* 1960;131:1312.

⁷⁶ Wurtman RJ, Axelrod J, Phillips LS. Melatonin synthesis in the pineal gland: control light. *Science* 1963;142:1071-3.

⁷⁷ Axelrod J, Wurtman RJ, Winget CM. Melatonin synthesis in the hen pineal gland and its control by light. *Nature* 1964;210:1134.

⁷⁸ Axelrod J, Wurtman RJ. The formation, metabolism and some actions of melatonin, a pineal gland substance. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1966;43:200-11.

⁷⁹ Wurtman RJ, Axelrod J. The physiologic effects of melatonin and the control of its biosynthesis. *Probl Actuels Endocrinol Nutr* 1966;10:189-200.

⁸⁰ Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 1974;184:1341-8.

⁸¹ Turek FW, Campbell CS. Photoperiodic regulation of neuroendocrine-gonadal activity. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1979;20(1):32-50.

⁸² Deguchi T. Circadian rhythms of indoleamines and serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal gland. *Mol Cell Biochem* 1979 28;27(1):57-66.

⁸³ Koella WP. The organization and regulation of sleep. A review of the experimental evidence and a novel integrated model of the organizing and regulating apparatus. *Experientia* 1984;40(4):309-38.

⁸⁴ Joffe RT, Brown P. Clinical and biological correlates of sleep deprivation in depression. *Can J Psychiatry* 1984;29(6):530-6.

⁸⁵ Maurizi CP. A mechanism of mania and the chemistry of dreams: a hypothesis. *South Med J* 1984;77(12):1491-3.

⁸⁶ Dubocovich ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J* 1988;2(12):2765-73.

-
- ⁸⁷ Tedesco SC, Morton DJ, Reiter RJ. Hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the pineal gland of the muscox (*ovibos moschatus*). *J Pineal Res* 1994;16(3):121-6.
- ⁸⁸ Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by gas chromatography. *J Pineal Research* 1995;18:28-31.
- ⁸⁹ Hattori A, Migitaka H, Ligo M. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Molec Biol Intern* 1995;3:627-34.
- ⁹⁰ Zawilska JB, Nowak JZ. Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem Int* 1992;20(1):23-36.
- ⁹¹ Lolley RN, Craft CN, Lee RH. Photoreceptors of the retina and pinealocytes of the pineal gland share common components of signal transduction. *Neurochem Res* 1992;17(1):81-9.
- ⁹² Greenblatt DJ, Shader RI. *Benzodiazepines in Clinical Practice*. Raven Press. New York 1974.
- ⁹³ Reves JG, Glass PSA. Anestésicos intravenosos no barbitúricos. En Miller RD ed.: *Anestesia*. Ediciones Doyma S.A. Barcelona 1993;219-51.

- ⁹⁴ Squires RF, Braestrup C. Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 1977;266:732.
- ⁹⁵ Fragen RJ. Diprivan (Propofol) A historical perspective. *Semin Anesthesia* 1988;7(1):1.
- ⁹⁶ Kay B, Rolly G. ICI 35868, a new intravenous induction agent. *Acta Anaesth Belg* 1977;28:303.
- ⁹⁷ Briggs LP, Clarke RSJ, Watkins J. An adverse reaction to the administration of disopropofol (Diprivan). *Anesthesia* 1982;37:1099.
- ⁹⁸ Marshall BE, Wollman H. Anestesia General. En: Goodman and Gilman eds. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Editorial Panamericana. México 1986; 276-99.
- ⁹⁹ Kissin I. General anesthetic action: an obsolete notion? *Anesth Analg* 1993;76:215-18.
- ¹⁰⁰ Vila P, Ibáñez MT, Canet J. Principios de la inducción anestésica inhalatoria y de la anestesia con bajos flujos. En F.E.E.A. ed.: *Farmacología en Anestesiología*. Ergón. Madrid 2003;87-106.

- ¹⁰¹ Yasuda N, Lockhart SH, Eger EI II, et al. Comparison of kinetics of sevoflurane and isoflurane in humans. *Anest Analg* 1991;72:316-24.
- ¹⁰² Peterson DO, Drummond JV, Todd MM. Effects of halotane, enflurane, isoflurane and nitrous oxide on somatosensory evoked potentials in humans. *Anesthesiology* 1986;65:35-40.
- ¹⁰³ Pocock G, Richards CD. Excitatory and inhibitory synaptic mechanisms in anaesthesia. *Br J Anest* 1993;71:134.
- ¹⁰⁴ Stevens WC, Kington HGG. Inhalation anesthesia. En Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, eds.: *Clinical Anesthesia*. J B Lippincott Company. Philadelphia 1989;293-338.
- ¹⁰⁵ Zhou HH, Mehta M, Leis AA. Spinal cord motoneuron excitability during isoflurane and nitrous oxide anesthesia. *Anesthesiology* 1997;86:302-7.
- ¹⁰⁶ Woodbridge PD. Changing concepts concerning depth of anesthesia. *Anesthesiology* 1957;18:536-40.

-
- ¹⁰⁷ Criado A, Castillo J, Suárez L, et al. Anestésicos intravenosos: barbitúricos, propofol, etomidato y ketamina. En F.E.E.A. ed.: Farmacología en Anestesiología. Ergón. Madrid 2003;107-26.
- ¹⁰⁸ Dalmas S. Benzodíacepines et antagoniste. En Lamy N, ed.: Pharmacologie en Anesthesiologie. Pradel. París 1994;101-4.
- ¹⁰⁹ Dahan A, Kest B. Recent advances in opioid pharmacology. Curr Opin Anaesthesiol 2001;14:405-10.
- ¹¹⁰ González F, Álvarez JA, Martí JL, et al. Bloqueantes neuromusculares, inhibidores de la colinesterasa, anticolinérgicos. En F.E.E.A. ed.: Farmacología en Anestesiología. Ergón. Madrid 2003;173-97.
- ¹¹¹ Bevan DR, Donati F. Muscle relaxants. In: Barash PG ed. Clinical Anesthesia. JB Lippincott Company Ed. Philadelphia 1992; 481-508.

-
- ¹¹² Gambús P, Seiz A. Bases farmacológicas de la administración continua de anestésicos: administración automatizada y retroalimentada de fármacos. En F.E.E.A. ed.: Farmacología en Anestesiología. Ergón. Madrid 2003;37-50.
- ¹¹³ Pinnock CA, Fischer HBJ, Jones RP. Principles and Practice. En: Peripheral Nerve Blockade. Churchill Livingstone. Edimburgh 2002;1-22.
- ¹¹⁴ Narahashi T. Basic pharmacology of local anesthetics. En Bowdle TA, Horita A, Krarasch ED, ed.: Pharmacologic Basis of Anesthesiology. Churchill Livingstone. New York 1994;179-94.
- ¹¹⁵ Macintosh R, Lee JA, Atkinson RS. Fisiología. En: Punción lumbar y analgesia espinal. SALVAT. Barcelona 1981;83-96.
- ¹¹⁶ Bonica JJ, Butler SH. Local anesthesia and regional blocks. En Wall PD, Melzack R, eds.: Textbook of Pain. Churchill Livingstone. New York 1994;997-1023.
- ¹¹⁷ Guesnon P, Chauvin M. Anesthésiques Locaux. En Duvaldestin P ed.: Pharmacologie en Pratique Anesthésique. Masson. París 1986;117-41.

-
- ¹¹⁸ Diemunsch P, Straja A. Raquianestesia. En Gauthier-Lafaye P, ed.: Anestesia Locorregional. Masson. Barcelona 1986;129-63.
- ¹¹⁹ Molnar R. Anestesia intradural, epidural y caudal. En Davison JK, Eckhardt III WF, Perese DA, eds.: Procedimientos de Anestesia Clínica del Massachusetts General Hospital. Masson-Little, Brown. Barcelona 1995;195-211.
- ¹²⁰ González R. La vía espinal en el tratamiento del dolor. En Aliaga L, Baños JE, Barutell C, et al: Tratamiento del dolor: teoría y práctica. Permanyer. Barcelona 2002;525-37.
- ¹²¹ Rodríguez MJ, Rodríguez MR. Dolor de origen osteomuscular. Dolor degenerativo. Osteoartrosis. En Gálvez R ed.: Actualización y Mejora en el Tratamiento del Dolor. Master Line, S.L. Madrid 2001;5-25.
- ¹²² Aliaga L, Baños JE, Barutell C, et al. Analgesia y opioides. En: Dolor y utilización clínica de los analgésicos. MCR. Barcelona 1996;81-110.
- ¹²³ Muriel C, Madrid JL. Situaciones especiales. En: Tratamiento Farmacológico del Dolor. Europharma, S.A. Madrid 1993;167-232.

¹²⁴ Ayuso M, Rustarazo M. Administración epidural e intratecal de fármacos. En Ruiz-Castro M, ed.: Manual Práctico de Dolor. PBM S.L. Madrid 2003;242-51.

¹²⁵ Flórez J, Reig E. Utilización clínica de los opiáceos en el tratamiento del dolor II: vía espinal. En: Terapéutica farmacológica del dolor. EUNSA. Pamplona 1993;103-19.

¹²⁶ Mohamed SA, Mohamed K, Borsook D. Elección del abordaje farmacoterapéutico: analgésicos no opioides y adyuvantes. En Borsook D, LeBel AA, McPeck B, eds.: Massachusetts General Hospital: Tratamiento del Dolor. Marban. Madrid 1999;76-104.

¹²⁷ Iribarren MJ, Panadero A, Pueyo J, et al. Fármacos anestésicos intravenosos utilizados en la sedación en las unidades de reanimación y anestesia locorregional. En Carrasco MS, ed.: Anestesia intravenosa. EDIKA MED. Barcelona 1977;341-430.

¹²⁸ Wetchler BV. Outpatient anesthesia. En Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, eds.: Clinical Anesthesia. J B Lippincott company. Philadelphia 1992;1389-416.

¹²⁹ Denis JP, Guidon-Attali C, Martín C. Indications et modalités pratiques de la sédation. En: Actualités en Réanimation et Urgences. Arnette. París 1992;25-76.

-
- ¹³⁰ Kruger-Thiemer E. Continuous intravenous infusion and multicompartment accumulation. Eur J Pharmacol 1968;4:317-24.
- ¹³¹ Gambús PL, Schnider TM, Minto CF. Caracterización del perfil de dosificación del remifentanilo mediante simulación con ordenador: estudio comparativo con fentanilo y alfentanilo. Rev Esp Anesthesiol Reanim 1998;45:317-25.
- ¹³² Stoelting MD. Benzodiazepines. En Stoelting MD eds.: Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice. Lippincott Company. Philadelphia 1992:118-33.
- ¹³³ Aguilera L, Taibo JM. Benzodiacepinas y Antagonistas. En F.E.E.A. ed.: Farmacología en Anestesiología. Ergón. Madrid 2003;127-42.
- ¹³⁴ Stephenson FA. GABA_A and glycine receptors. En Hucho F ed.: Neurotransmitter Receptors. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam 1993;183-220.
- ¹³⁵ Aguilera L. Farmacología comparada de las benzodiacepinas utilizadas en anestesiología-reanimación. En Aguilera L, ed.: Actualizaciones en anestesiología y reanimación. MCR. Barcelona 1988:135-45.

-
- ¹³⁶ Nilsson A. Benzodiazepines and their reversal. En Kay B ed.: Monographs in Anaesthesiology: Total Intravenous Anesthesia. Elsevier Science Publishers BV 1991;21:56-80.
- ¹³⁷ Blew P, Miller D, Martineau R, et al. Midazolam does not prolong recovery following total intravenous anesthesia with propofol/alfentanil. Can J Anaesth 1994;41:A63.
- ¹³⁸ Pholman AS, Simpson KP, May JB. Continuous intravenous infusion of lorazepam versus midazolam for sedation during mechanical ventilatory support: A randomized prospective study. Crit Care Med 1994;22:1241.
- ¹³⁹ Calvey TN. Drugs used in premedication and antiemetic agents. En Calvey TN, ed.: principles and practice of Pharmacology for Anesthetists. Blackwell Science. London 2001; 229-36.
- ¹⁴⁰ Van den Berg PCM, Bovill JG. Benzodiazepines. En Bovill JG ed.: Clinical Pharmacology for Anaesthetists. Saunders. Philadelphia 1999;76-83.
- ¹⁴¹ Prieto M, García-Sánchez MJ. Hipnóticos. En Torres LM: Tratado de Anestesia y Reanimación. Editorial Arán. Madrid 2001;867-900.
- ¹⁴² Mackenzie N, Grant IS. Propofol for intravenous sedation. Anaesthesia 1987;42:3.

¹⁴³ Wilson E, Mackenzie N, Grant IS. A comparison of propofol and midazolam by infusion to provide sedation in patients who receive spinal anesthesia. *Anaesthesia* 1988;43:91.

¹⁴⁴ Fanard L, Van Steenberge A, Demeirey A, et al. Comparison between propofol and midazolam as sedative agents for surgery under regional anesthesia. *Anaesthesia* 1988;43:87.

¹⁴⁵ Beller JP, Pottecher T, Lugnier A, et al. Prolonged sedation with propofol in ICU patients. Recovery and blood concentration changes during periodic interruptions in infusion. *Br J Anaesth* 1988;61:583.

¹⁴⁶ Grounds RM, Lalor JM, Lumley J, et al. Propofol infusion for sedation in the intensive care unit: Preliminary report. *Br Med J* 1985;294:397.

¹⁴⁷ Wurtman RJ, Moskowitz MA. The Pineal Organ. *N Engl J Med* 1977;296:1329.

¹⁴⁸ Ganong WF. Otros órganos con funciones endocrinas conocidas posibles. En Ganong WF ed.: *Fisiología Médica. El Manual Moderno*. México 1982;373-78.

-
- ¹⁴⁹ Ganong WF. Centros nerviosos que regulan las funciones viscerales. En Ganong WF ed.: Fisiología Médica. El Manual Moderno. México 1982;182-202.
- ¹⁵⁰ Webb SM, Puig-Domingo M. Role of melatonin in health and disease. *Clinical Endocrinology* 1995;42:221-34.
- ¹⁵¹ Wakabayashi H, Shimada K, Satoh T. Effects of adrenergic blockers or bicuculline on diazepam induced changes in rat pineal melatonin synthesis in vivo and in vitro. *Chem Pharm Bull* 1991;39:2677-2680.
- ¹⁵² Olofsson K, Alling C, Lundberg D, Malmros C. Abolished circadian rhythm of melatonin secretion in sedated and artificially ventilated intensive care patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:679-684.
- ¹⁵³ Mundigler G, Delle-Karth G, Koreny M, et al. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2002;30:536-540.
- ¹⁵⁴ Lowenstein PR, González C, Cardinali DP. In vitro uptake of benzodiazepines by rat pineal gland. *J Pineal Res* 1984;1(3):207-213.

-
- ¹⁵⁵ Rosenstein RE, Chuluyan HE, Díaz MC, Cardinalli DP. GABA as a presumptive paracrine signal in the pineal gland. Evidence on an intrapineal gabaergic system. *Brain Res Bull* 1990;25(2):339-344.
- ¹⁵⁶ McIntyre IM, Norman TR, Burrows GD, Armstrong SM. Alterations to plasma melatonin and cortisol after evening alprazolam administration in humans. *Chronobiol Int* 1993; 10(3):205-213.
- ¹⁵⁷ Djeridane Y, Touitou Y. Chronic diazepam administration differentially affects melatonin synthesis in rat pineal and harderian glands. *Psychopharmacology* 2001;154(4):403-407.
- ¹⁵⁸ Monteleone P, Forziati D, Orazzo C, Maj M. Preliminary observations on the suppression of nocturnal plasma melatonin levels by short-term administration of diazepam in humans. *J Pineal Res* 1989;6:253-258.
- ¹⁵⁹ Djeridane Y, Touitou Y. Effects of diazepam and its metabolites on nocturnal melatonin secretion in the rat pineal and harderian glands. A comparative in vivo and in vitro study. *Chronobiol Int* 2003;20(2):285-297.
- ¹⁶⁰ Nishimura S, Fujino Y, Shimaoka M, Hagihira S, Taenaka N, Yoshiya I. Circadian secretion patterns of melatonin after major surgery. *J Pineal Res* 1998;25(2):73-77.

¹⁶¹ Reber A, Huber PR, Ummenhofer W, et al. General anesthesia for surgery can influence circulating melatonin during daylight hours. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998;42(9):1050-1056.

¹⁶² Kärkelä J, Vakkuri O, Kaukinen S, Huang W-Q, Pasanen M. The influence of anesthesia and surgery on the circadian rhythm of melatonin. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002;46:30-36.

¹⁶³ Esposti D, Esposti G, Lissoni P, Parravicini L, Fraschini F. Action of morphine on melatonin release in rat. *J Pineal Res* 1998;5:35-39.

¹⁶⁴ Lowenstein PR, Pereyra EN, González C, Cardinali DP. Effect of naloxone on the nocturnal rise of rat pineal melatonin content. *Eur J Pharmacol* 1984;98(2):261-264.

¹⁶⁵ Vician M, Zeman M, Herichova I, Jurani M, Blazicek P, Matis P. Melatonin content in plasma and large intestine of patients with colorectal carcinoma before and after surgery. *J Pineal Res* 1999;27:164-169.

¹⁶⁶ Palazidou E, Beer MS, Checkley S, Stahl SM. Pharmacologic exploitation of neurotransmitter receptors for the design of novel antidepressant drugs. *Drug Des Deliv* 1988;2(4):247-256.